

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

GABRIELLA XAVIER MARETTO PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AO
INSETICIDA FOSFOROAMIDOTIOATO DE O,S-DIMETILA
(METAMIDOFÓS) SOBRE O REFLEXO BEZOLD-JARISCH E SOBRE
O QUIMIORREFLEXO EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

VITÓRIA
2012

GABRIELLA XAVIER MARETTTO PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AO
INSETICIDA FOSFOROAMIDOTIOATO DE O,S-DIMETILA
(METAMIDOFÓS) SOBRE O REFLEXO BEZOLD-JARISCH E SOBRE
O QUIMIORREFLEXO EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Suely Gomes de Figueiredo

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio

VITÓRIA
2012

Pinheiro, Gabriella Xavier Maretto

Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição ao inseticida fosforoamidotioato de O,S-dimetila (metamidofós) sobre o reflexo Bezold-Jarisch e sobre o quimiorreflexo em animais experimentais / Gabriella Xavier Maretto Pinheiro – 2012.

87 p.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Suely Gomes de Figueiredo

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Metamidofós 2. Reflexo Bezold-Jarisch 3. Quimiorreflexo 4. Função cardiovascular
5. Colinesterase 6. CK-MB 7. LDH

GABRIELLA XAVIER MARETTO PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AO
INSETICIDA FOSFOROAMIDOTIOATO DE O,S-DIMETILA
(METAMIDOFÓS) SOBRE O REFLEXO BEZOLD-JARISCH E SOBRE
O QUIMIORREFLEXO EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 29 de junho de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Suely Gomes de Figueiredo
Dept^o. Ciências Fisiológicas – UFES
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio
Dept^o. Ciências Farmacêuticas – UFES
Co-orientadora

Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade
Dept^o. Departamento de Farmácia - UVV

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez
Dept^o. Ciências Fisiológicas – UFES

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon
Dept^o. Ciências Fisiológicas – UFES
Coordenadora do PPGCF – UFES

Dedico aos meus pais e ao meu irmão. Em especial ao meu esposo por todo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo que tenho e por tudo o que sou. E em especial, pela oportunidade e o privilégio de ter feito do estudo e pesquisa, o meu trabalho.

Aos meus pais, Débora e Gilberto, que não mediram esforços para que pudessem dar o melhor a mim e ao meu irmão. Os nossos maiores incentivadores do estudo, a nossa base. Minha eterna gratidão e carinho. Ao meu querido irmão Ciro, obrigada por sua amizade e apoio. Lembre-se que você teve um papel muito importante na minha caminhada como professora, pois foi o meu primeiro “aluno”. Amo todos vocês.

Ao meu amado esposo, Filipe, que esteve comigo em todos os momentos, desde o pré-vestibular, me acompanhando, principalmente, me apoiando nessa jornada de estudos e trabalho. Obrigada por tudo, pelo seu amor e dedicação.

A todos os meus familiares, tios (as), primos (as) e avó, que me apoiaram nessa longa caminhada de estudos. Em especial agradeço à tia Ada, por não só ter me incentivado, mas também todos os outros sobrinhos, presenteando-nos com livros.

Aos meus sogros, Mário e Edméa, pelo amor, apoio e pela maravilhosa convivência. Estimo-os como meus pais.

À Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio pela orientação, comprometimento, apoio, compreensão, amizade e confiança em meu trabalho. Obrigada por tudo.

À Prof^a. Dr^a. Suely Gomes de Figueiredo pela oportunidade de ser aluna da PPGCF e por toda a atenção prestada durante meu trabalho. Obrigada por todo o seu apoio e incentivo. E também ao seu aluno de iniciação científica, Pedro, pelo auxílio nas dosagens enzimáticas e a todos os demais integrantes de seu laboratório pelo ótimo convívio.

Ao Prof. Dr. Hélder Mauad por ter aberto o seu laboratório, disponibilizando equipamentos e reagentes para que a pesquisa pudesse ser executada. Obrigada também pelo suporte prestado por seus alunos Pablo e Élio durante a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg pela contribuição na elaboração do artigo.

À Prof^a. Dr^a. Nazaré de Souza Bissoli pelo agradável convívio no laboratório e por ter disponibilizado os seus equipamentos. Aos seus alunos, em especial Poliana, Aline, Isabela e Pablo pela amizade e companhia.

À Cristina Nascimento e Luciana Passamani por toda amizade e parceria nos experimentos.

A todos os professores não citados e demais alunos do PPGCF.

À Prof^a. Dr^a. Vanessa Beijamini Harres, que tive o privilégio de conhecer e compartilhar os experimentos na área comportamental que, infelizmente, não fazem parte da tese, mas serão importantes para a confecção de um futuro artigo. Obrigada pela dedicação, ensino e amizade.

Ao Prof. Dr. Tadeu Uggere pela sua contribuição na discussão da tese e do artigo, como também nos experimentos realizados.

Agradeço também aos outros professores e funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas que contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica, Soninha e Evaldo, pelo auxílio no manuseio do espectrofotômetro termostatizado.

À BIOCLIN por ter doado os kits utilizados no presente trabalho e também ao Sr. Fernando José de Sousa, responsável pelo laboratório de Análises Clínicas da HUCAM, pela doação dos tubos de ensaio.

Ao pessoal do biotério por todo o trabalho que eles desenvolvem para que as pesquisas sejam concretizadas. Além de todos aqueles que fiscalizam e coordenam o trabalho realizado por esse setor.

Agradeço também aos integrantes da comissão dos discentes (Cláudia, Pedro e Ludimila) pelo belo e brilhante trabalho junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria; revelam prudência todos os que o praticam. O seu louvor permanece para sempre.”

Salmos 111.10

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo Geral	38
2.2 Objetivos Específicos	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Animais Experimentais	40
3.2 Letalidade do Metamidofós	40
3.3 Grupos Experimentais e Ensaios Biológicos	40
3.4 Dosagens Enzimáticas	41
3.4.1 Determinação da Atividade da Colinesterase Plasmática (CHE)	41
3.4.2 Determinação da Atividade da Creatina Quinase Fração MB (CK-MB)	43
3.4.3 Determinação da Atividade da Desidrogenase Láctica (LDH).....	46
3.5 Ensaio Cardiovasculares	47
3.5.1 Canulação da Artéria e Veia Femoral	47
3.5.2 Registro da Pressão Arterial e da Frequência Cardíaca	48
3.5.2 Avaliação do Quimiorreflexo.....	49
3.5.3 Avaliação do Reflexo Bezold-Jarisch	49
3.6 Análise Estatística	49
4 RESULTADOS.....	52
4.1 Análise de Letalidade do Metamidofós.....	52
4.2 Atividades das Enzimas Colinesterase Plasmática, CK-MB e LDH	53
4.3 Dados Hemodinâmicos	56
4.4 Avaliação do Reflexo Bezold-Jarisch (RBJ)	57
4.5 Avaliação do Quimiorreflexo.....	58
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66

7 REFERÊNCIAS.....	68
8 TRABALHOS PUBLICADOS	82

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fórmulas estruturais. (A) Estrutura química geral dos organofosforados, (B) Estrutura química do metamidofós.....26
- Figura 2:** Mecanismos candidatos para bioativação do metamidofós: S e N-oxidação27
- Figura 3:** Via metabólica do metamidofós em ratos (Crossley & Tutass, 1969)28
- Figura 4:** Mecanismo de inibição da acetilcolinesterase por compostos organofosforados30
- Figura 5:** Reação de hidrólise do substrato propioniltiocolina pela colinesterase plasmática e formação do cromóforo 5-tio-2-nitrobenzoato42
- Figura 6:** Rato com veia e artéria femorais cateterizadas. (A) Animal com a cânula inserida na artéria e veia femorais. (B) Animal com as cânulas exteriorizadas na região médiocervical posterior, pós-canulação.48
- Figura 7:** Curva de ajuste da função logística relacionando a proporção de letalidade em função da dose de metamidofós (mg/kg). DL₅₀, dose letal mediana.52
- Figura 8:** Atividade da colinesterase plasmática de ratos tratados com salina (CON; 0,9%, n=10; barra clara) ou metamidofós (MTF; 8mg/kg, n=10; barra hachurada). A atividade colinesterásica é expressa como porcentagem do controle.....53
- Figura 9:** Atividade da creatina quinase fração MB (CK-MB) de ratos tratados com salina (CON; 0,9%, n=10; barra clara) ou metamidofós (MTF; 8mg/kg, n=10; barra hachurada). U/L, unidades internacionais por litro.54
- Figura 10:** Atividade da lactato desidrogenase (LDH) de ratos tratados com salina (CON; 0,9%, n=9; barra clara) ou metamidofós (MTF; 8 mg/kg, n=9; barra hachurada). U/L, unidades internacionais por litro.54
- Figura 11:** Delta percentual de frequência cardíaca ($\Delta\%$ FC) frente à administração de doses crescentes de fenilbiguanida (FBG=1,5; 3,0; 6,0; 12 e 24 μ g/kg) a ratos tratados agudamente com metamidofós (MTF; 8 mg/kg, n=9; barras hachuradas) ou com salina (CON; 0,9%, n=10; barras claras). bpm, batimentos por minuto.....57
- Figura 12:** Deltas de pressão arterial média (PAM, painel A) e frequência cardíaca (FC, painel B), frente à administração de doses crescentes de cianeto de potássio (KCN; 10, 20, 40 e 80 μ g/rato) em ratos tratados agudamente com metamidofós

(MTF; 8mg/kg, n=14; barras hachuradas) ou com salina (CON; 0,9%, n=10; barras claras). mmHg, milímetros de mercúrio; bpm, batimentos por minuto.58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Procedimento para a preparação dos padrões com a finalidade de calcular o fator.	43
Tabela 2: Reagente 01 do kit CK-MB (enzimas e substratos).	44
Tabela 3: Reagente 02 do kit CK-MB.	44
Tabela 4: Reagente 01 do kit LDH UV: substrato tamponado.	46
Tabela 5: Reagente 02 do kit LDH-UV.	46
Tabela 6: Valores de atividade das enzimas CK-MB e LDH no soro dos animais tratados com metamidofós (MTF; 8mg/kg) ou salina (CON; 0,9%).	55
Tabela 7: Valores de PAM e FC basais dos animais tratados com metamidofós (MTF; 8 mg/kg) ou salina (CON; 0,9%).	56

LISTA DE ABREVIATURAS E/ OU SIGLAS

ABIFINA, Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AK, Adenilato cinase

ADP, Adenosina difosfato

ATP, Adenosina trifosfato

C, Caminho óptico do equipamento

CEUA, Comitê de Ética em Experimentação Animal

ChE, Colinesterase plasmática

CK, Creatina quinase

CK-MB, Creatina quinase fração MB

CK-MM, Creatina quinase fração MM

COBEA, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CON, Grupo Controle

DL₅₀, Dose letal mediana

DTNB, Ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico

ε (Epsilon), Coeficiente de Absortividade do Composto Corado ou Substrato

FBG, Fenilbiguanida

FC, Frequência Cardíaca

G-6-PDH, Glicose-6-fosfato desidrogenase

HK, Hexoquinase

i.p., Intraperitoneal

i.v., Intravenoso

LDH, Desidrogenase láctica

MTF, Grupo Metamidofós

NAD⁺, Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

NADH, Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADP⁺, Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH, Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

OF, Organofosforados

PA, Pressão Arterial

PAM, Pressão Arterial Média

PAP, Pressão Arterial Pulsátil

RBJ, Reflexo Bezold-Jarisch

SH, grupo sulfidrílico livre

SINDAG, Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

SINITOX, Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

UFES, Universidade Federal do Espírito Santo

VA, Volume de Amostra

VD, Volume de Diluente

VR, Volume de Reagente

VT, Volume Total

RESUMO

RESUMO

Intoxicações por compostos organofosforados são muitas vezes acompanhadas por complicações cardíacas, que podem ser graves e até fatais. No entanto, os efeitos desses compostos sobre os mecanismos cardiovasculares envolvidos na regulação da pressão arterial não são conhecidos. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da administração de uma dose subletal (8 mg/kg, i.p.) do organofosforado metamidofós sobre o reflexo Bezold-Jarisch (RBJ) e sobre o quimiorreflexo, bem como os efeitos desta administração sobre a atividade das enzimas colinesterase plasmática (ChE), creatina quinase-MB (CK-MB) e desidrogenase láctica (LDH). Para os protocolos envolvendo os reflexos cardiovasculares, ratos machos Wistar foram tratados com injeções intraperitoniais únicas de metamidofós (8,0 mg/kg; n=23; grupo MTF) ou solução salina (0,9%; n=20; grupo controle, CON). Vinte quatro horas após as injeções, os animais foram submetidos à cateterização da artéria e veia femorais para registros pressóricos e administração de drogas, respectivamente. Os registros cardiovasculares foram realizados 24 horas após os procedimentos cirúrgicos de cateterização. O quimiorreflexo e o RBJ foram ativados por administração intravenosa (i.v.) aleatória de doses crescentes de KCN (10, 20, 40 e 80 µg/rato) e fenilbiguanida (FBG; 1,5; 3,0; 6,0; 12 e 24 µg/kg), respectivamente. As respostas bradicárdicas do RBJ foram expressas como % de queda em relação aos níveis basais, enquanto que as respostas do quimiorreflexo foram expressas em deltas de pressão arterial média e frequência cardíaca. Grupos separados de ratos, submetidos ao mesmo protocolo de tratamento, foram usados para os protocolos de dosagem das atividades de ChE (n=10/grupo), CK-MB (n=10/grupo) e LDH (n=9/grupo) e as amostras de sangue coletadas 24 horas após o tratamento. A análise estatística empregada para avaliação dos reflexos foi análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas, com análise *post hoc* pelo teste de Fisher e para as dosagens enzimáticas, o teste t-Student. O componente bradicárdico do quimiorreflexo e RBJ foi significativamente atenuado em animais tratados com metamidofós. Do mesmo modo, a atividade colinesterásica foi significativamente reduzida nos animais tratados com este composto. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas atividades de CK-MB e LDH entre os grupos estudados (CON e MTF). Nossos dados mostram que

o tratamento agudo com o metamidofós prejudica a função de dois reflexos cardiovasculares, o que poderia contribuir para as complicações cardiovasculares observadas na intoxicação aguda por estes compostos.

Palavras-chave: Metamidofós, reflexo Bezold-Jarisch, quimiorreflexo, função cardiovascular, colinesterase, CK-MB, LDH.

ABSTRACT

ABSTRACT

Poisoning by organophosphate pesticides is often accompanied by cardiac complications which may be serious and even fatal. However, the effects of these compounds on the cardiovascular mechanisms involved in blood pressure regulation remain unknown. The aim of this study was to evaluate the effects of the administration of a single sublethal dose (8 mg/kg, i.p.) of the organophosphorus insecticide methamidophos on the Bezold-Jarisch reflex (BJR) and on the chemoreflex, as well as the effects of this administration on the activity of the plasma cholinesterase (ChE), creatin kinase-MB (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH). For the protocols involving the cardiovascular reflexes, male Wistar rats were treated with single intraperitoneal injections of methamidophos (8 mg/kg; n=23; MTF group) or saline (0.9%, n=20; control group, CON). Twenty four hours after the injection procedure the animals underwent catheterization of the femoral artery and vein to allow pressure recordings and drugs administration, respectively. Cardiovascular recordings were performed 24 hours after the catheterization procedures. The chemoreflex and BJR were activated by intravenous (i.v.) injections randomly assigned of KCN (10, 20, 40 and 80 µg/rat) and phenylbiguanide (PBG, 1.5, 3, 6, 12 and 24 µg/kg), respectively. The bradycardic responses of the BJR were expressed as % of fall compared to baseline levels, while the chemoreflex responses were expressed as delta mean arterial pressure and heart rate. Separated groups of rats were treated similarly for the protocols involving measurement of the ChE (n=10/group), CK-MB (n=10/group) and LDH (n=9/group) and blood samples collected 24 h after the treatment. The statistical analysis used for the cardiovascular reflexes was one-way ANOVA for repeated measures followed by the Fisher's *post hoc* test and for the enzymatic protocols was the Student's t-test. The bradycardic component of the chemoreflex and of the BJR was significantly attenuated in animals treated with methamidophos. Similarly, the cholinesterase activity was significantly reduced in animals treated with this compound. However, no statistical differences were observed in the CK-MB and LDH activities between the studied groups (CON and MTF). Our data show that the acute treatment with methamidophos impairs the function of two cardiovascular reflexes, which could contribute to the cardiovascular complications observed in the acute poisoning by these compounds.

Keywords: Methamidophos, Bezold-Jarisch reflex, chemoreceptor reflex, cardiovascular function, cholinesterase, CK-MB, LDH.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O termo “agrotóxicos”, segundo a Lei Federal n.º 7802, de 11/07/89, é definido como: “os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento” (BRASIL, 1989).

Tradicionalmente, os agrotóxicos são classificados de acordo com a sua especificidade de ação e ao grupo químico a que pertencem. De acordo com a sua ação, podem ser classificados em: inseticidas, herbicidas, nematicidas, carrapaticidas, rodenticidas, fungicidas, molusquicidas. Em cada uma dessas classes, existe uma ampla diversidade de estruturas químicas, por exemplo: os inseticidas são classificados de acordo com esse critério em organoclorados, organofosforados, piretróides e carbamatos (Ecobichon, 2001; OPAS, 1996).

Outra classificação para estes compostos, com base na sua toxicidade, é apresentada pelo Ministério da Saúde, Portaria Nº 3, de 16 de janeiro de 1992 (BRASIL, 1992), conforme descrição abaixo:

Classe I - Produtos Extremamente Tóxicos;

Classe II - Produtos Altamente Tóxicos;

Classe III - Produtos Medianamente Tóxicos;

Classe IV - Produtos Pouco Tóxicos.

No Brasil, o consumo de agrotóxicos cresceu bastante nos últimos anos, transformando o país em um dos líderes mundiais no consumo desses compostos. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades (ABIFINA), o faturamento do setor agroquímico foi de US\$ 5,4 bilhões em 2007 e passou para US\$ 7,1 bilhões em 2008. Neste período, as importações de agrotóxicos aumentaram em 55% (ABIFINA, 2009). Seguindo essa tendência, o ano de 2010 foi considerado pela indústria de defensivos como o melhor ano de vendas do setor e conforme o levantamento do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), o segmento faturou US\$ 7,24 bilhões (SINDAG, 2011).

A crescente utilização dos agrotóxicos tem causado impacto negativo sobre os ecossistemas, tais como, contaminação do solo e da água (Filho et al., 2003; Neto e Siqueira, 2005), bem como sobre a saúde humana, resultando em intoxicações que podem culminar na morte dos indivíduos expostos (Bochner, 2007; Caldas et al., 2008; Recena et al., 2006).

Numa compilação de dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) do período de 1999 a 2002, Mendonça e Marinho (2005) mostraram que os agrotóxicos de uso agrícola, os de uso doméstico, produtos veterinários e raticidas configuraram como um dos principais agentes causais de intoxicações, sendo superados somente pelos medicamentos e pelos envenenamentos por animais peçonhentos. Dados mais recentes mostram que este mesmo perfil de intoxicação foi observado em 2009 (SINITOX, 2009).

Uma ampla diversidade de agrotóxicos está disponível para utilização em nosso meio rural, segundo disposto na Portaria Nº 10, de 08 de março de 1985, do Ministério da Saúde (BRASIL, 1985), estando assim o agricultor em situação de extrema vulnerabilidade frente a esses produtos, já que muitos trabalhadores utilizam-nos inadequadamente e sem equipamentos de proteção (Delgado e Paumgarten, 2004; Oliveira-Silva et al., 2001). Além disso, os agricultores sofrem com a pressão da indústria e do comércio para o uso de produtos de alta toxicidade e com a precariedade dos mecanismos de vigilância (Peres e Moreira, 2003). Isso é agravado pelo baixo nível socioeconômico e cultural da maior parte desses

trabalhadores (Delgado e Paumgartten, 2004; Oliveira-Silva et al., 2001). Todavia, essa exposição não fica restrita apenas às populações do meio rural, mas também aos consumidores, que acabam ingerindo resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos (ANVISA, 2006; Caldas e Souza, 2000).

Entre os inseticidas, os organofosforados (OF), agentes anticolinesterásicos, são considerados um dos principais responsáveis por intoxicações, óbitos e tentativas de suicídios no Brasil (Araújo et al., 2007; Delgado e Paumgartten, 2004; Recena et al., 2006). O metamidofós é um representante do grupo dos OF, sendo utilizado no meio rural, principalmente nas culturas de soja, feijão, legumes, hortaliças e algodão. Esse composto é extremamente tóxico (classe toxicológica I) e conhecido comercialmente como: Hamidop, Tamaron, Metafós entre outros (Mídio e Martins, 2000). Entretanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), segundo RDC nº 1, de 14 de janeiro de 2011, determinou o banimento do metamidofós do mercado brasileiro, sendo a sua utilização permitida somente até junho de 2012 (ANVISA, 2011). De fato, conforme nota técnica do metamidofós publicada pela ANVISA, esse ingrediente ativo já foi banido em diversos países (China, Costa do Marfim, Japão, Kwait, Indonésia, Paquistão), mas em nações como os EUA, Austrália, Canadá, Panamá e Tailândia, o metamidofós continua sendo utilizado, embora de maneira restrita.

Os compostos organofosforados são ésteres do ácido fosfórico ou fosforotióicos. A estrutura química geral desses compostos está representada na figura 1A. Os radicais X e Y podem ser grupos alquila, alquóxi e amido e o radical Z, arila, alquila e alquóxi (Ecobichon, 2001). O metamidofós, cuja nomenclatura química é fosforoamidotioato de O, S-dimetila (International Programme on Chemical Safety, 1993; Midio e Martins, 2000), apresenta em sua estrutura um grupamento amido, conforme representado na figura 1B.

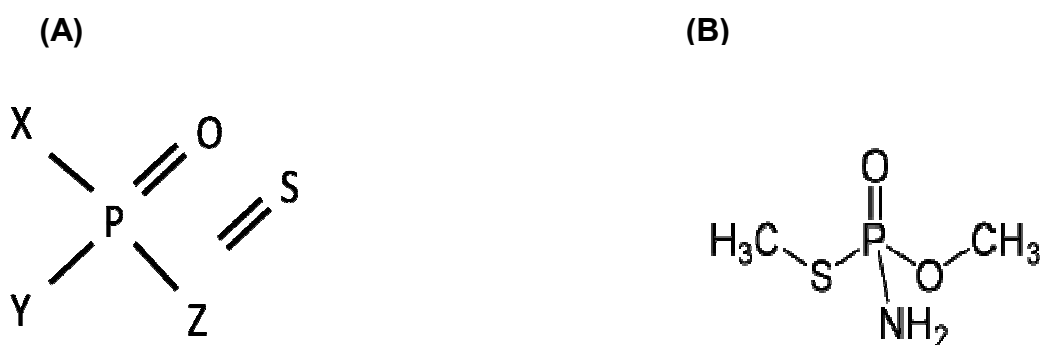


Figura 1: Fórmulas estruturais. (A) Estrutura química geral dos organofosforados, (B) Estrutura química do metamidofós. Fonte: (A) Ecobichon, 2001, (B) <http://pt.wikipedia.org/wiki/Metamidof%C3%B3s>.

O metamidofós, assim como outros OF, pode ser absorvido pelas vias dérmica, gastrointestinal e respiratória, resultando em marcantes efeitos tóxicos sistêmicos (California Environmental Protection Agency, 2005; Food And Agriculture Organization Of The United Nations, 1996; International Programme On Chemical Safety, 1993). Um reconhecido perigo ocupacional é a inalação de compostos OF durante a pulverização, mistura ou fabricação, embora, o contato com a pele e subsequente absorção seja a principal via de exposição ocupacional. A ingestão não é comum no ambiente de trabalho, mas pode ocorrer acidentalmente em trabalhadores com pouca higiene pessoal, tais como aqueles que não removem a roupa contaminada ou deixam de lavar as mãos após a manipulação destes compostos. Nestes casos, as intoxicações são geralmente leves. No entanto, intoxicação grave por absorção gastrointestinal pode ser observada após a ingestão deliberada de um inseticida OF (Vale, 1998). Como a maioria dos inseticidas OF são lipofílicos, sua absorção após inalação ou ingestão se processa rapidamente. Embora, a absorção dérmica seja lenta, a exposição prolongada pode ocasionar intoxicações graves (Vale, 1998).

Posteriormente à absorção, os OF se acumulam rapidamente no tecido adiposo, fígado, rins e glândulas salivares (Vale, 1998). Entretanto, este padrão de bioacumulação não parece ser confirmado pelos dados de solubilidade do metamidofós. Por outro lado, esse composto possui a capacidade de atravessar tanto a barreira placentária (Salama, 1990), quanto à hematoencefálica, provocando

pela transposição desta última, marcantes manifestações neurológicas (Jokanovic e Kosanovic, 2010).

Os OF são inibidores da acetilcolinesterase (anticolinesterásicos). Todavia, os ésteres fosforotíóicos ($P=S$) necessitam ser biotransformados por um processo de dessulfuração oxidativa em seus análogos fosfatos ($P=O$) para tornarem-se biologicamente ativos (Vale, 1998). Eto e colaboradores (1977) propuseram uma via de bioativação do metamidofós, envolvendo a S-oxidação. Já Mahajna e Casida (1998) analisaram outra via metabólica de bioativação para o metamidofós (Figura 3). Nesta via o composto sofre uma N-hidroxilação como alternativa para a S-oxidação, anteriormente proposta por Eto e colaboradores (1977). Todavia, os metabólitos gerados por essas vias apresentam menor potência em inibir a acetilcolinesterase do que o próprio metamidofós, provavelmente devido a rápida hidrólise destes compostos (Mahajna e Casida, 1998; Eto et al., 1977). De fato, Gray e colaboradores (1982), por meio de estudos com o metamidofós radiomarcado, mostraram que o próprio metamidofós parece ser responsável pela toxicidade direta sobre a acetilcolinesterase.

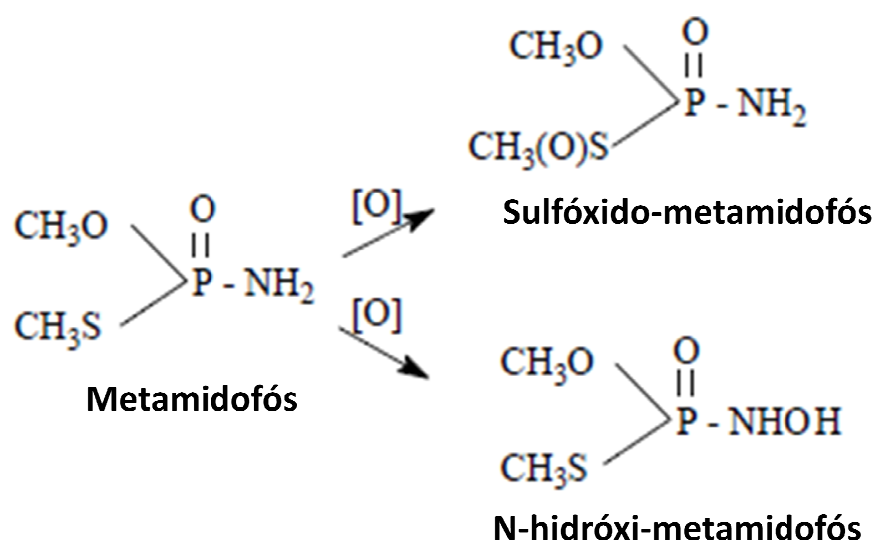


Figura 2: Mecanismos candidatos para bioativação do metamidofós: S e N-oxidação. Fonte: figura adaptada de Mahajna e Casida, 1998.

O processo de biotransformação envolve também reações que culminam com a inativação dos agentes tóxicos. Dependendo do grupo químico substituinte do “esqueleto” básico dos OF, sua biotransformação pode ser obtida por meio de reações de fase I (oxidação, hidrólise, redução) e reações de fase II (síntese e conjugação) (Ecobichon, 2001). O metamidofós, particularmente, sofre reações de hidrólise e desmetilação (via metabólica em ratos proposta por Crossley e Tutass em 1969) (figura 2). O processo se inicia com hidrólise da ligação P-N, formando amônia e O,S-dimetil-fosforotioato. Esse último metabólito sofre desmetilação, formando metil-dihidrogênio fosfato, o qual também pode ser desmetilado, formando ácido fosfórico. Os produtos da biotransformação do metamidofós em mamíferos são toxicologicamente insignificantes (International Programme on Chemical Safety, 1993).

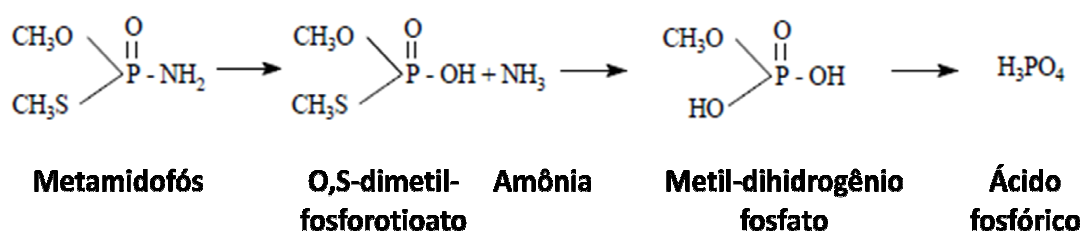


Figura 3: Via metabólica do metamidofós em ratos (Crossley & Tutass, 1969).
Fonte: figura adaptada de California Environmental Protection Agency, 2005.

Quanto ao processo de excreção do metamidofós, sabe-se que acontece principalmente pela urina e pelos pulmões e, em menor proporção, pelas fezes (Gray et al., 1982; Internacional Programme on Chemical Safety, 1993). Gray e colaboradores (1982) observaram que 24 horas após a administração de metamidofós radiomarcado [$^{14}\text{CH}_3\text{S}$] em ratos Sprague-Dawley, 47% da radioatividade foram recuperados na urina, ao passo que 34% foram eliminados pelos pulmões sob a forma de $^{14}\text{CO}_2$. Já a taxa de recuperação nas fezes foi menor do que 5%, mas perdurou por mais de 7 dias. Do mesmo modo, Crossley e Tutass (1969) notaram que, após administração de metamidofós radiomarcado (^{32}P metamidofós), pequenas quantidades podiam ser recuperadas nas fezes por mais de 28 dias. Deste modo, pode-se observar por estes estudos que a principal via de

excreção dos metabólitos do metamidofós acontece por via renal e em menor proporção pela fecal, embora, por esta última, a eliminação perdure por mais tempo.

Em relação aos mecanismos de toxicidade, conforme já mencionado, a ação principal dos OF consiste na inibição das enzimas hidrolases de éster carboxílicos. Estas enzimas incluem a acetilcolinesterase, também chamada de colinesterase verdadeira, encontrada nos tecidos nervoso, muscular e nas membranas celulares de eritrócitos (colinesterase eritrocitária), e a butirilcolinesterase, também conhecida como colinesterase plasmática ou pseudocolinesterase, presente no plasma, pâncreas, coração, fígado e cérebro (Clark, 2006; Kwong, 2002; Namba et al., 1971).

O mecanismo molecular de inibição da acetilcolinesterase por estes agrotóxicos consiste na fosforilação da cadeia lateral (grupo hidroxil) do resíduo de serina do sítio ativo dessa enzima. O composto intermediário resultante desta fosforilação pode sofrer hidrólise com regeneração da enzima ou sofrer um processo denominado de “envelhecimento” (*“aging”*) (figura 4) (Kwong, 2000). A regeneração espontânea da acetilcolinesterase alquilfosforilada depende da estrutura química dos compostos organofosforados, sendo mais comum naqueles que apresentem dois grupos metila (ex.: dimetoato, malation) ou dois grupos etila (ex.: diazinon, paration). No processo conhecido como “envelhecimento” (*“aging”*), as enzimas fosforiladas perdem um grupo alquila em aproximadamente 48 horas. A enzima “envelhecida” permanece fosforilada e não pode ser regenerada por hidrólise espontânea. Nesse estágio, a regeneração não é possível nem pelo uso de antídotos a base de oxima, os quais agem reativando a acetilcolinesterase fosforilada (Vale, 1998).

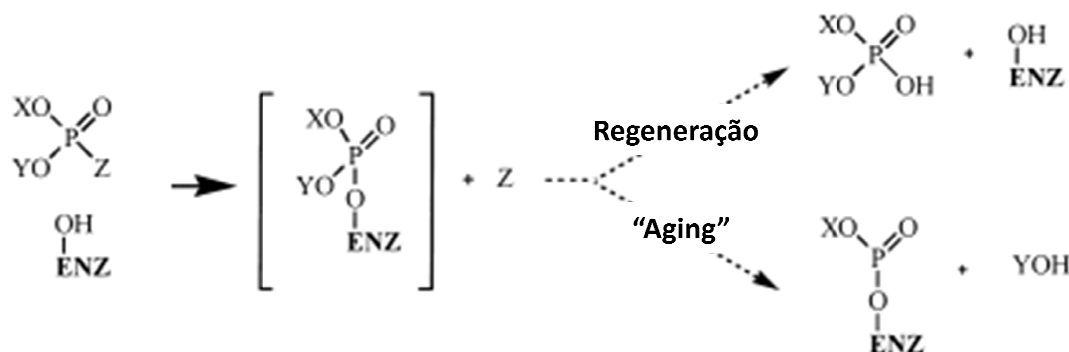


Figura 4: Mecanismo de inibição da acetilcolinesterase por compostos organofosforados. Fonte: figura adaptada de Kwong, 2002.

A atividade colinesterásica plasmática e eritrocitária é utilizada para o diagnóstico e monitoramento de intoxicações por organofosforados (Coye et al., 1987; Eddleston et al., 2008). Estas enzimas apresentam cinéticas diferentes frente à inibição por agentes anticolinesterásicos, sendo que as alterações mais precoces são observadas na atividade da colinesterase plasmática (Gray et al., 1982; Kwong, 2002). Adicionalmente, alguns agrotóxicos inibem mais eficientemente a butirilcolinesterase do que a acetilcolinesterase (Eddleston et al., 2005). Embora, a atividade da butirilcolinesterase não esteja relacionada com a gravidade do envenenamento (Nouira et al, 1994); essa pode ser usada como um marcador sensível de exposição para a maioria dos compostos organofosforados, bem como, de outros agentes anticolinesterásicos (Eddleston et al., 2008).

A ação tóxica dos OF sobre a acetilcolinesterase resulta em excesso de acetilcolina tanto em sinapses muscarínicas e nicotínicas do sistema nervoso periférico quanto em receptores de acetilcolina do sistema nervoso central. A hiperestimulação muscarínica pode resultar em vômito, diarreia, cólicas abdominais, lacrimejamento, salivação, sudorese, micção, defecação, broncorréia, broncoconstrição, miose, hipotensão, bradicardia e distúrbios de condução, enquanto que as manifestações nicotínicas incluem fraqueza muscular, fasciculação, hipertensão, paralisia, taquicardia e parada cardiorrespiratória. Já os efeitos no sistema nervoso central

incluem tremor, cefaléia, sonolência, confusão, convulsões e coma (Ecobichon, 2001; O'Malley, 1997).

Dentre este amplo espectro de sinais e sintomas, despertam um particular interesse e preocupação, as consequências dos envenenamentos por OF sobre o sistema cardiovascular. De fato, diversos estudos clínicos evidenciam essa realidade (Anand et al., 2009; Roth et al., 1993; Saadeh et al., 1997; Yurumez et al., 2007). As manifestações cardiovasculares presentes em intoxicações por esses compostos refletem efeitos mistos sobre o sistema nervoso autonômico (Clark, 2006). Em pacientes intoxicados, pode-se observar: hipertensão, hipotensão, taquicardia sinusal, bradicardia sinusal e anormalidades no eletrocardiograma (Anand et al., 2009; Karki et al., 2004; Namba et al., 1971; Roth et al., 1993; Saadeh et al., 1997; Yurumez et al., 2007). Adicionalmente, alguns estudos têm demonstrado que intoxicações por organofosforados podem levar até mesmo a danos musculares (De Bleecker, 1995; Jeyarasasingam et al., 2000; John et al., 2003), inclusive sobre o tecido cardíaco (Roth et al., 1993). Necrópsia de dois pacientes envenenados por OF mostraram dano miocárdico difuso (Chharba et al., 1970). Em uma série de casos de envenenamentos por organofosforados, Kiss e Fazekas (1979) relataram que alguns pacientes apresentaram características transitórias de infarto do miocárdio. Neste sentido, além das marcantes alterações eletrocardiográficas observadas no atendimento de pacientes intoxicados por OF e carbamatos, alguns apresentaram um aumento significativo na atividade das enzimas creatina quinase fração MB (CK-MB) e lactato desidrogenase (LDH) (Saadeh et al., 1997). Estas enzimas constituem importantes marcadores de lesão do músculo cardíaco, sendo usadas principalmente no diagnóstico do infarto do miocárdio (Godoy et al., 1998). A CK-MB é uma das três isoformas do dímero CK, creatina quinase, e está presente principalmente no músculo cardíaco e em menor grau no músculo esquelético. Já a LDH é encontrada em todas as células do organismo, mas predominantemente no fígado, coração, rim, músculo esquelético e eritrócitos. Ambas são encontradas no citosol celular, portanto, aumento na atividade destas enzimas está associado a eventos que caracterizam dano celular (Moss e Henderson, 1998).

Os sintomas observados pela ação dos OF sobre o sistema cardiovascular podem também estar acompanhados por distúrbios respiratórios (Eddleston et al., 2006;

Karki et al., 2004; Saadeh et al., 1997). Dentre os efeitos dos OF sobre este sistema, podemos observar broncorréia, broncoconstricção e até mesmo paralisia dos músculos respiratórios, este último efeito sendo resultante da ação dos OF sobre a atividade muscular esquelética (Clark, 2006). A paralisia dos músculos respiratórios em combinação com a broncorréia, broncoconstricção e depressão respiratória, em parte, centralmente mediada, levam à hipoxemia e parada respiratória (Clark, 2006). Sendo assim, a combinação da ação sobre estes dois sistemas, cardiovascular e respiratório, aumenta a chance de óbito do paciente intoxicado por parada cardiorrespiratória (Clark, 2006; Yurumez et al., 2007).

A despeito destes relatos de marcantes desordens clínicas observadas após o envenenamento agudo por OF, o mecanismo exato envolvido na toxicidade desses compostos não está completamente esclarecido. Particularmente, nenhum estudo até o presente momento investigou o impacto destas intoxicações sobre os mecanismos neurais de regulação da pressão arterial. Uma vez que a inibição da colinesterase pelos OF, com consequente acúmulo de acetilcolina, pode resultar em ativação de gânglios simpáticos e parassimpáticos, bem como, de núcleos centrais envolvidos na regulação da pressão arterial (PA), não é improvável que estes mecanismos de regulação sejam alterados na intoxicação por OF. É importante ressaltar ainda que, apesar das inúmeras evidências mostrando que o envenenamento agudo severo promove sérias mudanças na PA e frequência cardíaca (FC), não se sabe se a exposição a doses subletais pode exercer prejuízo sobre os mecanismos básicos de regulação cardiovascular ou até mesmo produzir lesões detectáveis sobre o tecido cardíaco, que poderiam contribuir para a toxicidade sobre este sistema. Deste modo, estudos experimentais avaliando os efeitos da exposição a doses subletais destes compostos sobre os mecanismos neurais de regulação da PA poderiam contribuir para a elucidação dos efeitos cardiotóxicos dos OF.

Sabe-se que a manutenção da PA em níveis normais, necessária para uma perfusão tecidual adequada, é um pré-requisito fundamental para a sobrevivência do indivíduo. Os mecanismos de ajuste da PA envolvem a regulação a curto-prazo e a regulação a longo-prazo. O controle a curto-prazo é efetuado por mecanismos reflexos neurais, que promovem uma estabilização rápida e eficiente da PA a cada

batimento cardíaco. Assim, esses reflexos sejam eles arteriais ou não-arteriais detectam e corrigem alterações na pressão arterial (barorreflexo), no volume sanguíneo ou na composição química (reflexos cardiopulmonares) e na tensão de oxigênio, gás carbônico e pH (quimiorreflexo) (ver Vasquez et al., 1997 para revisão).

Dentre estes reflexos, o barorreflexo constitui uma importante ferramenta no controle da PA por promover ajustes rápidos nesse parâmetro. Essa ação se inicia por meio de mecanorreceptores localizados nas paredes do arco aórtico e do seio carotídeo. Esses receptores são sensíveis às alterações de tensão produzida na parede dos vasos pelas ondas de pressão sistólica ou por elevações súbitas da PA. A ativação destes receptores gera potenciais de ação, os quais são transmitidos ao sistema nervoso central por meio de aferências barorreceptoras que caminham juntamente com os nervos vago e glossofaríngeo. Quando ocorre um aumento súbito da PA, a ativação barorreflexa promove simultaneamente uma elevação da atividade parassimpática para o coração e uma diminuição da atividade simpática tanto para os vasos de resistência quanto para o coração (Spyer, 1990). Isto resulta em bradicardia, redução da contratilidade cardíaca, redução da resistência vascular periférica e conseqüentemente, uma diminuição do débito cardíaco e da PA. Em contrapartida, a queda da PA é compensada por um decréscimo na descarga aferente barorreceptora, promovendo alterações exatamente opostas às acima descritas para os componentes autonômicos.

Todavia, o controle reflexo da circulação não depende somente do barorreflexo, mas também, em grande parte, dos reflexos cardiopulmonares (Zanchetti e Mancia, 1991). Os receptores envolvidos na ativação dos reflexos cardiopulmonares estão localizados nos átrios, ventrículos, vasos pulmonares e parênquima pulmonar (Krayner, 1961; Kappagoda et al., 1972). Estes receptores são ativados por mudanças na pressão de enchimento cardíaco e por agentes químicos (Zucker, 1989). A ativação dos receptores ventriculares, mais especificamente do ventrículo esquerdo (Dawes, 1947; Paintal, 1973), por agentes químicos refere-se ao reflexo Bezold-Jarisch (RBJ). O RBJ é um epônimo para uma tríade de respostas, compreendendo apnéia, bradicardia e hipotensão, observadas após a injeção intravenosa de alcalóides do veratrum em animais experimentais. Os primeiros

relatos sobre esse reflexo foram feitos por Von Bezold e Hirt, sendo posteriormente confirmados em 1938-1940 por Jarisch (Aviado e Aviado, 2001). Além desses alcalóides, outras substâncias tais como a bradicinina, as prostaglandinas, a serotonina e a fenilbiguanida também são capazes de ativar estas terminações quimiossensíveis (Verberne et al., 2003). Uma vez ativadas estas terminações, os sinais induzidos são conduzidos principalmente por fibras aferentes vagais não-mielinizadas do tipo C (Coleridge et al., 1964; Krayner, 1961; Muers e Sleight, 1972; Paintal, 1955). A ativação dos receptores quimiossensíveis induz apnéia, bradicardia e hipotensão por inibição vasomotora simpática (Chein, 1979; Verberne e Guyenet, 1992; Campagna e Carter, 2003) e um aumento simultâneo do tono vagal para o coração. Essa ativação também acarreta uma diminuição da atividade simpática para o nervo renal (DiBona, 1989; Kashiara et al., 2004).

Apesar de ser ainda incerto qual o papel fisiológico do RBJ, estudos de Chianca Jr. e Machado (1994) demonstraram um aumento na sensibilidade do RBJ tanto em animais desnervados (região sinoaótica) agudamente quanto cronicamente, sugerindo um papel fisiológico para este reflexo na regulação cardiovascular. Em contrapartida, estudos apontam para uma importante regulação circulatória desempenhada por este reflexo em situações patológicas, como isquemia miocárdica aguda (Meyrelles et al., 1996; Robertson et al., 1985). Nestas situações, uma potente estimulação dos quimiorreceptores cardíacos exerce um efeito cardioprotetor ao induzir hipotensão e bradicardia, reduzindo assim o esforço excessivo do músculo cardíaco (Schultz, 2001). Dados da literatura também demonstram alterações no RBJ em animais experimentais hipertensos (Araújo et al., 1998; Peotta et al., 2001), com hipertrofia cardíaca (Meyrelles et al., 1998 ; Uggere et al., 2000) e em casos de infarto do miocárdio (Meyrelles et al., 1997).

Outro mecanismo neural que participa ativamente da regulação cardiorrespiratória é o quimiorreflexo (Machado, 2001; Marshall, 1994; Schultz e Li, 2007; Spyer, 1990). Várias evidências na literatura indicam que os quimiorreceptores periféricos participam tanto do controle da ventilação, quanto dos mecanismos neurais envolvidos na regulação da PA (Spyer, 1990; Felder e Mifflin, 1994). Estes receptores encontram-se distribuídos em corpúsculos carotídeos e aórticos, localizados bilateralmente na bifurcação da artéria carótida comum

(quimiorreceptores carotídeos) ou em pequenos corpúsculos espalhados entre o arco aórtico e a artéria pulmonar (quimiorreceptores aórticos) (Sapru e Krieger, 1977). A presença destes receptores depende da espécie dos animais, estando os corpúsculos aórticos geralmente ausentes no coelho, rato e camundongo (Easton e Howe, 1983). Os corpúsculos carotídeos são formados por dois tipos celulares, as células do tipo I (células glomais ou quimiossensíveis), intimamente associadas aos capilares sanguíneos, e pelas células do tipo II (células de sustentação) (Kock, 1951). As células glomais são altamente especializadas, capazes de detectar alterações da pressão parcial de oxigênio (pO_2), pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2) e concentração hidrogeniônica do sangue (pH) (Biscoe, 1971).

Esses receptores quando estimulados por redução dos níveis de pO_2 ou pH ou ainda aumento da pCO_2 encaminham sinais ao bulbo, onde induzem mudanças nas vias simpática e parassimpática, modulando o coração e vasos sanguíneos, bem como no nervo frênico, controlando a atividade pulmonar (Spyer, 1990). A estimulação dos receptores promove tanto aumento da atividade do sistema nervoso simpático vascular, induzindo vasoconstricção, aumento da resistência periférica e consequente aumento da pressão arterial, quanto da atividade do sistema nervoso parassimpático cardíaco, induzindo bradicardia (Franchini e Krieger, 1993; Haibara et al., 1995). Além disso, a resposta respiratória do quimiorreflexo ocorre, basicamente, pela ativação de neurônios respiratórios localizados no bulbo, aumentando a frequência de disparos do nervo frênico, levando ao aumento da frequência e da amplitude do padrão respiratório. Portanto, em situações de hipóxia, esses receptores são ativados para promover ajustes cardiorrespiratórios, mantendo órgãos vitais adequadamente perfundidos (Kara et al., 2003).

Vários autores têm demonstrado uma forte relação entre os ajustes mediados pelos quimiorreceptores periféricos e a hipertensão (Fukuda et al., 1987; Somers et al., 1988a; Trzebski et al., 1982). Fletcher e colaboradores (1992) demonstraram que ratos expostos cronicamente a curtos períodos de hipóxia apresentaram aumento da pressão arterial, não sendo o mesmo efeito observado em ratos submetidos à desnervação do nervo do seio carotídeo. Adicionalmente, foi demonstrado que pacientes com apnéia do sono apresentaram aumento na resposta do quimiorreflexo periférico induzida por hipóxia (Narkiewicz et al., 1998). Outros estudos também

mostram que, na hipertensão arterial crônica, os quimiorreceptores periféricos, em particular os carotídeos, podem apresentar alterações morfológicas e bioquímicas (Trzebski, 1992; Habeck, 1991). Este fato é representado pelo trabalho de Smith e colaboradores (1984), no qual se observou que ratos espontaneamente hipertensos apresentavam um aumento no tamanho dos corpos carotídeos.

Dada a relevância destes dois reflexos na manutenção da PA e considerando, conforme relatado, que a exposição aguda aos OF promove mudanças marcantes no plano cardiorrespiratório e que nenhuma pesquisa, até o presente, avaliou os efeitos dos OF sobre esses reflexos, nosso estudo se dedicou a avaliar esta questão.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A abordagem proposta neste trabalho visou avaliar o efeito da exposição aguda a uma dose subletal do inseticida metamidofós em ratos sobre os reflexos cardiovasculares, sobre a integridade cardíaca e atividade da colinesterase plasmática.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a curva de letalidade do metamidofós por via intraperitoneal;
- Avaliar as atividades das enzimas colinesterase plasmática, LDH e CK-MB no soro de ratos submetidos ao tratamento agudo com uma dose subletal de metamidofós;
- Verificar o efeito do tratamento agudo com uma dose subletal de metamidofós sobre os níveis basais de pressão arterial média e frequência cardíaca;
- Avaliar o efeito do tratamento agudo com uma dose subletal de metamidofós sobre o reflexo Bezold-Jarisch e o quimiorreflexo.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para os ensaios biológicos foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss*, pesando entre 20 e 25 g e ratos Wistar machos, pesando entre 300 e 350g. Ambas as espécies foram cedidas pelo Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com dimensões de 27 x 18 x 13 cm, alocando no máximo quatro animais por gaiola, com água e ração *ad libitum* em ciclo claro/escuro de 12 h. Os experimentos foram desenvolvidos segundo as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UFES n ° 058/2010).

3.2 LETALIDADE DO METAMIDOFÓS

Uma curva de letalidade do metamidofós foi determinada em camundongos, com o objetivo de estimar uma dose subletal que pudesse ser utilizada para tratamento dos animais envolvidos nos protocolos cardiovasculares. Para isso, os camundongos foram submetidos a 12 horas de jejum e receberam doses crescentes (3, 8, 11, 12, 13, 14 e 25 mg/kg de peso corporal) de metamidofós (fosforamidotioato de O,S-dimetila; 60% m/v, Tamaron, Bayer) contidas em 0,5 mL de solução fisiológica (NaCl; 0,9%) via intraperitonal (i.p.). Foram utilizados 20 camundongos por dose (n=20) e o total de mortes por dose foi computado ao longo de 24 horas após injeções. A letalidade do metamidofós foi avaliada por uma análise de regressão logística da proporção de mortes computadas. Com base nesse ensaio foi escolhida a dose de 8 mg/kg para a realização dos experimentos enzimáticos e cardiovasculares.

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para os protocolos enzimáticos e cardiovasculares, foi utilizado um total de 63 ratos divididos em dois grupos:

- Grupo tratado (MTF, n=33): os animais receberam uma dose única de 8 mg/kg de metamidofós (fosforamidotioato de O,S-dimetila; 60% m/v, Tamaron, Bayer) diluído em solução de NaCl 0,9%, por via intraperitonal (volume injetado 0,5 mL).
- Grupo controle (CON, n=30): os animais receberam apenas veículo (0,9% de solução de NaCl, volume injetado 0,5 mL) por via intraperitonal numa única injeção.

3.4 DOSAGENS ENZIMÁTICAS

As atividades das enzimas colinesterase plasmática (ChE) (n=10/grupo), creatina quinase fração MB (CK-MB) (n=10/grupo) e desidrogenase láctica (LDH) (n=9/grupo) foram dosadas no soro de animais controle (CON) e tratado com metamidofós (MTF).

Para esse procedimento, amostras de sangue foram coletadas de animais submetidos à decapitação 24 horas após o tratamento. O soro foi obtido por centrifugação à 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Para dosagem das atividades da ChE e da LDH, as amostras de soro foram armazenadas a - 80°C até o momento da dosagem. Já, para a dosagem da atividade da CK-MB, as amostras foram armazenadas a 4°C no período de até uma semana após a coleta.

3.4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA COLINESTERASE PLASMÁTICA (CHE)

A atividade colinesterásica foi determinada segundo o método colorimétrico descrito por Dietz et al. (1977) com algumas modificações, usando kit para a determinação da colinesterase da marca DOLES (Goiânia, Brasil). A determinação da atividade dessa enzima teve como objetivo avaliar a eficácia do tratamento com o inseticida metamidofós.

O princípio da técnica, mostrado na figura 5, baseia-se na hidrólise da propioniltiocolina pela colinesterase plasmática, produzindo ácido propiônico e tiocolina. O grupo tiol livre (SH) da tiocolina reage com ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico (DTNB), levando à formação de um cromóforo amarelo (5-tio-2-nitrobenzoato), o qual possui absorção máxima a 410 nm.

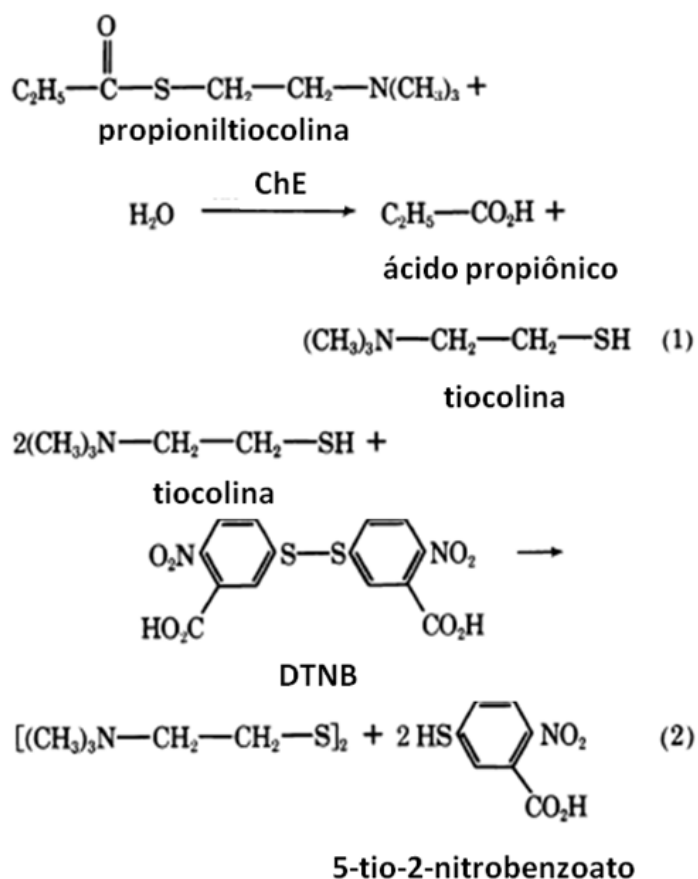


Figura 5: Reação de hidrólise do substrato propioniltiocolina pela colinesterase plasmática e formação do cromóforo 5-tio-2-nitrobenzoato. Fonte: figura adaptada de Dietz et al., 1977.

Para determinação da atividade, alíquotas de 250 µL de substrato (iodeto de propioniltiocolina – solução 0,134 M) e 750 µL do reagente de cor (solução de 0,423 M de DTNB em tampão fosfato pH 7,6), foram pré incubadas em banho-maria termostatzado a 37°C, durante 3 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 10 µL da amostra (soro de animais do grupo CON e MTF) e paralisada, após um período de 2 minutos e 30 segundos, pela adição de 750 µL de solução inibidora (solução de sulfato de quinidina 0,5%). A absorbância do cromóforo formado foi lida a 410 nm e as dosagens foram realizadas em duplicata.

Para eliminar interferentes de aspectos físicos das amostras (icterícia, lipemia, entre outros), foi preparado um branco para cada amostra, contendo todos os reagentes

nas quantidades da reação acima, sendo, todavia, a solução inibidora adicionada antes da amostra.

A atividade foi expressa em U.I./mL, (uma U.I. de colinesterase é a quantidade de enzima que hidrolisa um μmol de substrato/minuto/mL de soro, 37°C), utilizando uma curva padrão preparada conforme tabela abaixo.

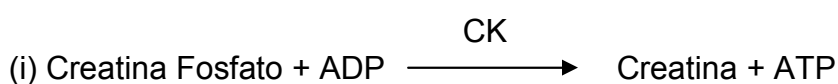
Tabela 1: Procedimento para a preparação dos padrões com a finalidade de calcular o fator.

Atividade (U.I./mL)	Água destilada	Padrão	Reagente de cor
7,00 U.I./mL	1 mL	5 μL	750 μL
3,50 U.I./mL	2 mL	5 μL	1500 μL
1,75 U.I./mL	4 mL	5 μL	3000 μL

3.4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CREATINA QUINASE FRAÇÃO MB (CK-MB)

A atividade da CK-MB foi avaliada utilizando kit CK-MB BIOCLIN (Minas Gerais, Brasil), o qual utiliza o método cinético otimizado por Szasz e colaboradores (1976).

O princípio da técnica consiste nas reações mostradas abaixo, que envolvem: (i) fosforilação da ADP (adenosina difosfato) pela transferência de um grupo fosforila da creatina fosfato com formação de ATP (adenosina trifosfato) e creatina, catalisada pela creatina quinase (CK); (ii) reação da glicose com o ATP, catalisada pela hexoquinase (HK), produzindo glicose-6-fosfato e ADP; (iii) oxidação da glicose-6-fosfato pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) NADP^+ dependente formando 6-fosfogliconato e NADPH. A atividade da CK é proporcional aos surgimentos do NADPH, o qual apresenta absorção em 340 nm.



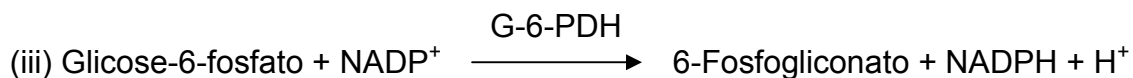
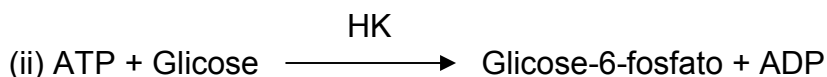


Tabela 2: Reagente 01 do kit CK-MB (enzimas e substratos).

Reagentes	Concentração
Creatina Fosfato	2000 U/L
Glicose-6-Fosfato desidrogenase	30 mmol/L
ADP	2 mmol/L
AMP (*)	5 mmol/L
Diadenosina pentafofato (*)	10 mmol/L

(*) inibidores da adenilato cinase (AK), enzima encontrada em concentração razoavelmente alta em todos os tecidos, incluindo as hemácias.

Tabela 3: Reagente 02 do kit CK-MB.

Reagentes	Concentração
Acetato de Imidazol (pH 6,7)	100 mmol/L
Glicose	20 mmol/L
EDTA (**)	2 mmol/L
NADP ⁺	2 mmol/L
Hexoquinase	3500 U/L
Acetato de Magnésio	10 mmol/L
N-acetilcisteína (**)	20 mmol/L
Anticorpo policlonal anti-CK-M (***)	Quantidade suficiente para inibir até 2000 U/L de CK-MM

(**) EDTA funciona como um quelante do Ca⁺², o que é importante para eliminar esse íon que compete com o Mg⁺² (ativador da CK). Além do Mg⁺², a N-acetilcisteína também contribui para a ativação dessa enzima.

(***) anticorpo específico contra a fração M, inibe completamente a atividade enzimática da CK-MM e a fração M do CK-MB.

Para determinação da atividade, uma alíquota de 500 µL do reagente de trabalho (4:1, reagente número 2 e 1) foi pré-incubada por 5 min a 37°C. Posteriormente, foram acrescentados 20 µL da amostra (diluída 20X em solução fisiológica). Após a homogeneização, esse conteúdo foi transferido para uma cubeta termostatizada a 37°C (espectrofotômetro Thermoplate - modelo TP Analyzer Plus). O produto NADPH foi lido, em 340 nm, minuto a minuto após os 5 minutos de pré-incubação. Esta cinética foi realizada em duplicata para cada amostra. A atividade foi expressa em U/L, utilizando o fator 8254, calculado conforme equação abaixo:

$$\text{FATOR} = \frac{\text{VT} \times 1000}{\text{VA} \times \epsilon \times \text{C}}$$

Sendo que:

- **VT= VA+ VR + VD**
- **VT=** Volume Total
- **VA=** Volume de Amostra
- **VR=** Volume de Reagente
- **VD=** Volume de Diluente quando utilizado,
- **C=** Caminho óptico do equipamento (cm)
- **ε** = Coeficiente de Absortividade molar

Assim:

VA= 20 µL

VR= 500 µL

VT= 520 µL

C= 1 cm

ε do NADPH=6,3

Considerando a presença do anticorpo específico contra a fração M e que as frações M e B apresentam atividades similares, o valor calculado para o fator deverá ser multiplicado por 2.

3.4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA DESIDROGENASE LÁCTICA (LDH)

A atividade dessa enzima foi determinada a partir da utilização do teste cinético do kit LDH UV BIOCLIN (Minas Gerais, Brasil), segundo método enzimático de Bergemeyer (1974).

O princípio da técnica consiste na reação mostrada abaixo, que consiste na redução do piruvato pela enzima LDH NADH-dependente, formando lactato e NAD^+ . A concentração catalítica é medida pela queda da absorvidade a 340 nm, a qual está relacionada com a velocidade de decomposição do NADH.



Tabela 4: Reagente 01 do kit LDH UV: substrato tamponado.

Reagentes	Concentração
Tampão TRIS (pH=7,4)	200 mmol/L
Piruvato	6 mmol/L
Azida sódica	15 mmol/L

Tabela 5: Reagente 02 do kit LDH-UV.

Reagentes	Concentração
Tampão Borato (pH=10)	20 mM
NADH	0,32 mmol/L
Azida sódica	15 mmol/L

Para determinação da atividade, uma alíquota de 500 μL do reagente de trabalho (9:1, reagente número 1 e 2) foi pré-incubada por 5 min a 37°C. Posteriormente, foram acrescentados 10 μL da amostra (diluída 10X em solução fisiológica). Após a homogeneização, esse conteúdo foi transferido para uma cubeta termostatizada a

37°C (espectrofotômetro Thermoplate - modelo TP Analyzer Plus). Após o primeiro minuto, as absorbâncias foram lidas minuto a minuto. Esta cinética foi realizada em duplicata para cada amostra. A atividade foi expressa em U/L, utilizando o fator 8016, calculado conforme equação abaixo:

$$\text{FATOR} = \frac{\text{VT} \times 1000}{\text{VA} \times \epsilon \times \text{C}}$$

Sendo que:

VA= 10 µL

VR= 500 µL

VT= 510 µL

C= 1 cm

ε do NADH= 6,362

3.5 ENSAIOS CARDIOVASCULARES

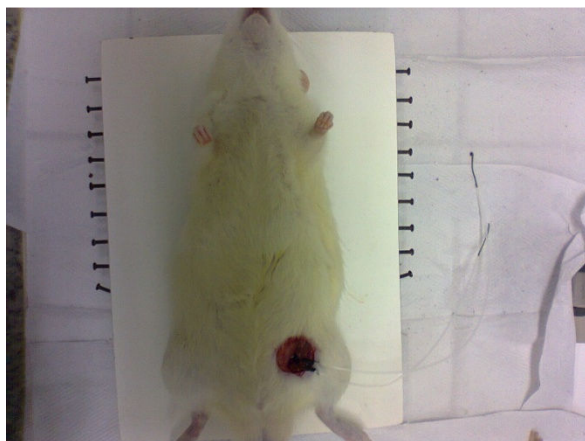
Para realização dos ensaios cardiovasculares, os ratos dos grupos MTF e CON foram cateterizados para permitir os registros de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), bem como a administração intravenosa de drogas. Este procedimento cirúrgico foi realizado nos animais previamente anestesiados com pentobarbital sódico 50 mg/kg, 24 horas após a administração intraperitonal de solução de metamidofós (grupo MTF) ou solução de NaCl 0,9% (grupo CON). A avaliação dos reflexos cardiovasculares (quimiorreflexo e o reflexo de Bezold-Jarisch) foi realizada nos animais acordados, 24 horas após os procedimentos de cateterismo. Ao final desses bioensaios, os animais foram sacrificados com sobredose do anestésico pentobarbital sódico.

3.5.1 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAL

O procedimento de canulação consiste na inserção de uma cânula na artéria femoral e outra na veia femoral em ratos previamente anestesiados (pentobarbital sódico 50 mg/kg), a partir de uma incisão na região inguinal. Essas cânulas foram confeccionadas a partir de um tubo de polietileno PE-10 (SIMS Portex Ltd, Kent,

Inglaterra) soldado a outro tubo de polietileno PE-50 (CPL MEDICAL'S, São Paulo, SP, Brasil). Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com salina e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Finalizada a cateterização, as cânulas foram dirigidas subcutaneamente com auxílio de um trocáter para a região médiocervical posterior, onde foram exteriorizadas e fixadas por uma linha de sutura. A cânula arterial foi utilizada para registro da pressão arterial e da frequência cardíaca e a cânula venosa para administração sistêmica de drogas. Após a canulação, os animais foram colocados em gaiolas individuais para recuperação com livre acesso à água e ração.

(A)



(B)



Figura 6: Rato com veia e artéria femorais cateterizadas. (A) Animal com a cânula inserida na artéria e veia femorais. (B) Animal com as cânulas exteriorizadas na região médiocervical posterior, pós-canulação.

3.5.2 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

No dia seguinte ao procedimento de canulação, foram feitos os registros de pressão arterial e de frequência cardíaca. O cateter arterial, previamente heparinizado (Liquemine, Roche, Rio de Janeiro, Brasil) (1:50), foi conectado a um transdutor de pressão (modelo PT 300; Grass Instrument Division, Warwick, NY, EUA), acoplado a um sistema de registro computadorizado (Biopac System MP100, Santa Bárbara,

Califórnia, EUA). A partir desse sistema, a PAP, PAM e FC foram registradas. Os registros de FC foram derivados pelo software a partir do sinal pulsátil de PA.

3.5.2 AVALIAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO

Para a estimulação dos quimiorreceptores periféricos, foi utilizada solução aquosa de cianeto de potássio (KCN, Impex, SP, Brasil) por via intravenosa, segundo o método descrito por Franchini e Krieger (1993). Em cada rato (MTF, n=14; CON, n=10), foram administradas aleatoriamente 10, 20, 40 e 80µg/rato, utilizando uma microseringa (Hamilton), aguardando-se um intervalo mínimo de 10 minutos entre as doses para estabilização dos parâmetros PAM e FC. Foram avaliadas as respostas hipertensivas e bradicárdicas desencadeadas pela ativação desse reflexo com o KCN.

3.5.3 AVALIAÇÃO DO REFLEXO BEZOLD-JARISCH

O reflexo foi ativado quimicamente pela injeção intravenosa *in bolus* de cinco doses randomizadas de fenilbiguanida (FBG, Sigma Aldrich Chemical): 1,5; 3,0; 6,0; 12 e 24 µg/kg de peso corporal dos ratos (MTF, n=9; CON, n=10), utilizando-se para injeção, uma microseringa Hamilton. O tempo entre cada injeção foi de aproximadamente 10 minutos. A sensibilidade do RBJ foi estudada por meio da análise da resposta bradicárdica máxima que foi induzida pela FBG e o reflexo foi identificado por meio de uma redução dose-dependente da frequência cardíaca (Uggere et al., 2000).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise dos dados de letalidade do metamidofós

Essa avaliação foi feita por meio de uma análise de regressão logística das proporções de mortalidade. A curva de letalidade dose-resposta foi construída a partir das proporções de mortalidade em função da dose, obedecendo o modelo logístico abaixo:

$$P(y|x_i) = [1 + \exp(-(\alpha + \beta x_i))]^{-1}$$

Em que P é a probabilidade esperada de morte a uma dada dose de x_i , α é o intercepto e β a inclinação (parâmetro de curvatura) da curva dose-resposta.

A estimativa da dose letal mediana da população (DL_{50}) foi calculada da seguinte forma:

$$DL_{50} = -\alpha/\beta$$

O erro padrão da dose letal mediana da população ($EP_{DL_{50}}$) foi estimado de acordo com Collett (2003), como se segue:

$$EP_{DL_{50}} = ((\text{Var}(\alpha) - 2(\alpha/\beta)\text{Cov}(\alpha, \beta) + (\alpha/\beta)^2 \text{Var}(\beta)) / \beta^2)^{1/2}$$

Os parâmetros de variâncias (Var) e covariâncias (Cov) foram fornecidos pela matriz de covariância do procedimento logístico do SAS (Statistical Analysis System, Cary, EUA).

Os efeitos significativos da regressão foram avaliados por meio de Wald's qui-quadrado $\chi^2_w = (\beta/EP)^2$, em que "EP" é o erro padrão do parâmetro inclinação (β) (Collett, 2003).

Análise dos dados dos experimentos cardiovasculares e dos ensaios enzimáticos

Para a avaliação tanto dos valores basais de PAM e FC quanto das dosagens enzimáticas foi utilizado o teste t-Student. Já a análise dos dados dos reflexos cardiovasculares foi feita utilizando-se a análise de variância (ANOVA) uma via para medidas repetidas, com análise *Post Hoc* pelo teste de *Fisher*. O nível de significância estatística foi fixado para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DE LETALIDADE DO METAMIDOFÓS

A curva de ajuste da função logística relacionando a frequência de mortes de camundongos frente a injeções intraperitoneais de metamidofós é apresentada pela figura 7. Como podemos observar, as doses inferiores a 8,0 mg/kg não induziram letalidade nos animais tratados; ao passo que, doses acima de 14,0 mg/kg induziram 100% de mortalidade nos animais tratados. Adicionalmente, por meio desta análise pode-se observar que a dose letal mediana (DL_{50}) do metamidofós, para camundongos, foi de 11,88 mg/kg.

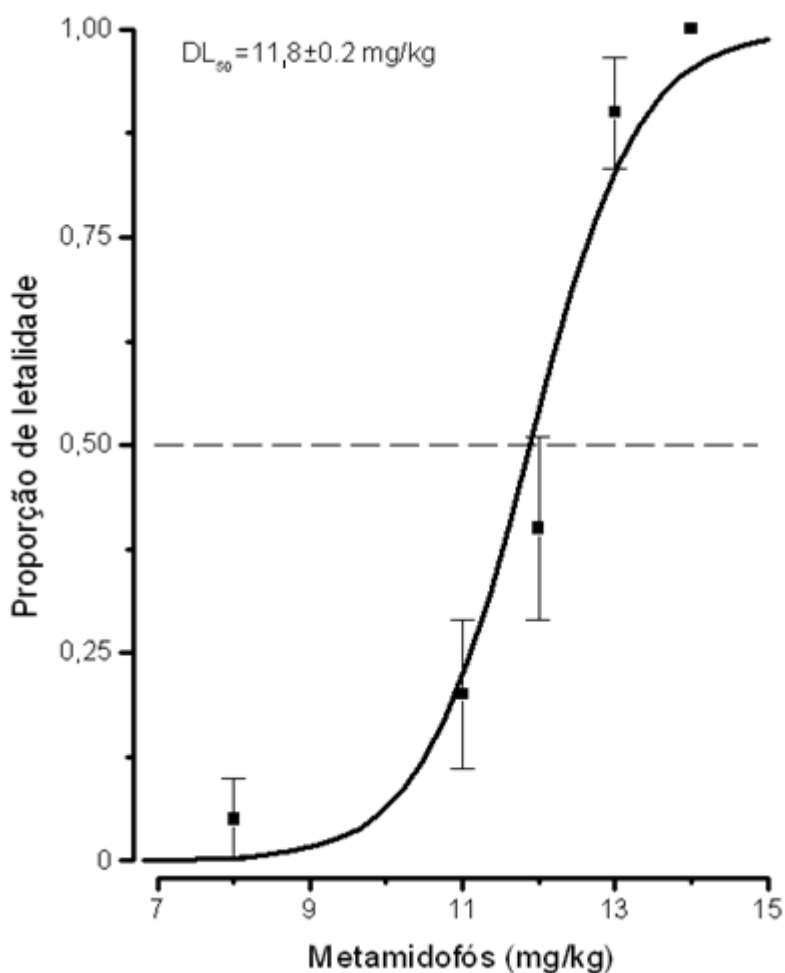


Figura 7: Curva de ajuste da função logística relacionando a proporção de letalidade em função da dose de metamidofós (mg/kg). DL_{50} , dose letal mediana.

4.2 ATIVIDADES DAS ENZIMAS COLINESTERASE PLASMÁTICA, CK-MB E LDH

A atividade da colinesterase medida em ratos tratados com salina foi de $5,0 \pm 0,29$ U.I./mL, ao passo que, os ratos tratados com metamidofós apresentaram $0,99 \pm 0,12$ U.I./mL de atividade da enzima ($p < 0,01$). Os dados da atividade plasmática da colinesterase expressos em % da atividade controle são apresentados na figura 8. O tratamento com metamidofós induziu 80% de redução ($p < 0,01$) na atividade da colinesterase quando comparado ao grupo controle tratado com salina.

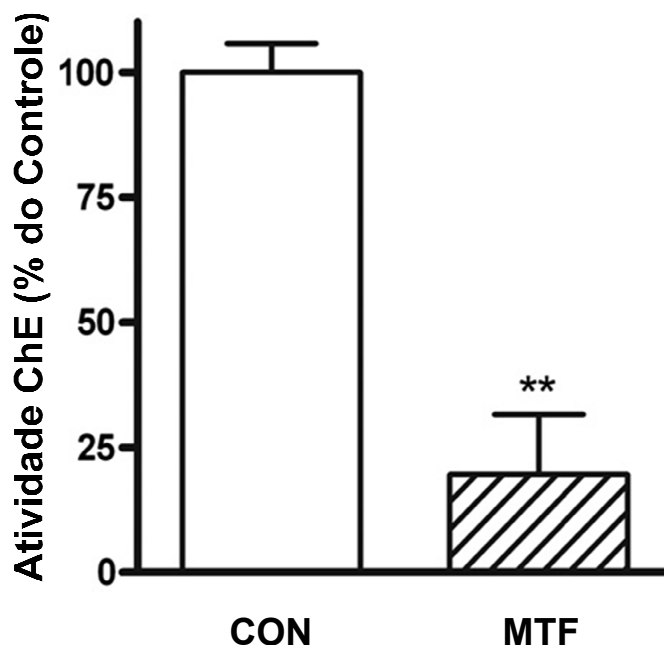


Figura 8: Atividade da colinesterase plasmática de ratos tratados com salina (CON; 0,9%, $n=10$; barra clara) ou metamidofós (MTF; 8mg/kg, $n=10$; barra hachurada). A atividade colinesterásica é expressa como porcentagem do controle.

** $p < 0,01$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle.

Os valores de atividade das enzimas CK-MB e LDH são apresentados nas figuras 9 e 10 e na tabela 6. Pode-se observar que o tratamento com metamidofós não induziu alteração significativa na atividade destas enzimas no soro dos ratos tratados quando comparado aos do grupo controle, tratados com salina.

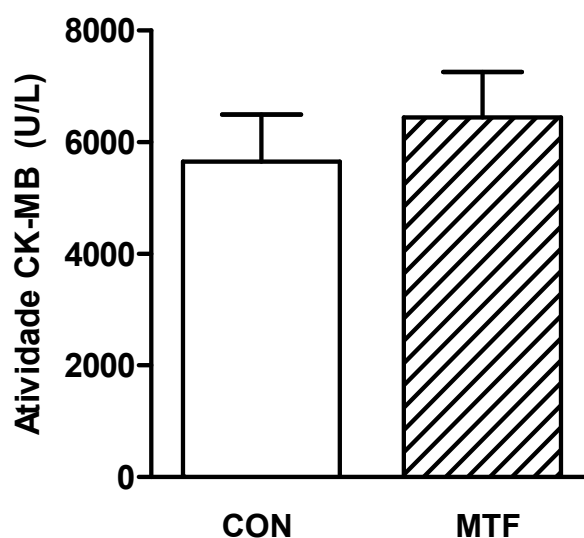


Figura 9: Atividade da creatina quinase fração MB (CK-MB) de ratos tratados com salina (CON; 0,9%, n=10; barra clara) ou metamidofós (MTF; 8mg/kg, n=10; barra hachurada). U/L, unidades internacionais por litro.

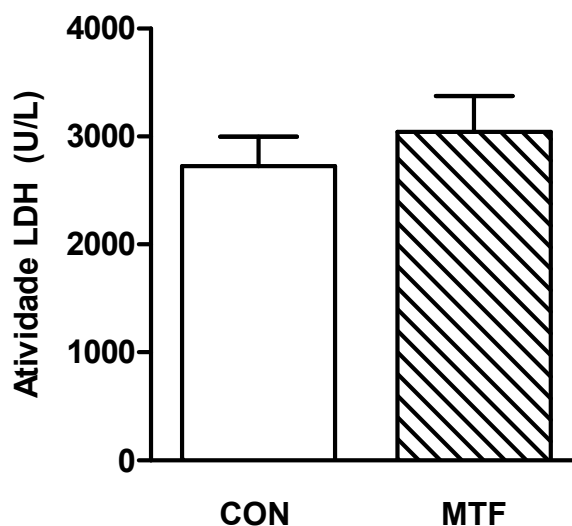


Figura 10: Atividade da lactato desidrogenase (LDH) de ratos tratados com salina (CON; 0,9%, n=9; barra clara) ou metamidofós (MTF; 8 mg/kg, n=9; barra hachurada). U/L, unidades internacionais por litro.

Tabela 6: Valores de atividade das enzimas CK-MB e LDH no soro dos animais tratados com metamidofós (MTF; 8mg/kg) ou salina (CON; 0,9%).

GRUPOS	CK-MB (U/L)	LDH (U/L)
	(n=10)	(n=9)
CON	5652 ± 895	2724 ± 276
MTF	6444 ± 821	3043 ± 332

Valores expressos como média ± EPM. U/L, unidades internacionais por litro.

4.3 DADOS HEMODINÂMICOS

Os resultados obtidos da medida da PAM e FC basais no grupo de ratos tratados com salina (CON; 0,9%) e tratados com metamidofós (MTF; 8 mg/kg) são mostrados na tabela 7. Como podemos observar estes parâmetros não apresentaram diferenças significantes entre os dois grupos estudados.

Tabela 7: Valores de PAM e FC basais dos animais tratados com metamidofós (MTF; 8 mg/kg) ou salina (CON; 0,9%).

GRUPOS	PAM (mmHg)	FC (bpm)
CON (n=20)	107±2	355±6
MTF (n=23)	111±2	350±6

Valores expressos como média ± EPM.

4.4 AVALIAÇÃO DO REFLEXO DE BEZOLD-JARISCH (RBJ)

A figura 11 apresenta os resultados obtidos na análise do RBJ nos animais tratados com metamidofós (MTF; 8 mg/kg, n=9) e com salina (CON; 0,9%, n=10). Os dados de frequência cardíaca foram expressos como deltas percentuais em relação aos níveis basais. Os dados mostram que o tratamento com metamidofós diminuiu significativamente as respostas bradicárdicas induzida pela administração de fenilbiguanida nas doses de 12 e 24 µg/kg quando comparadas as respectivas doses no grupo controle.

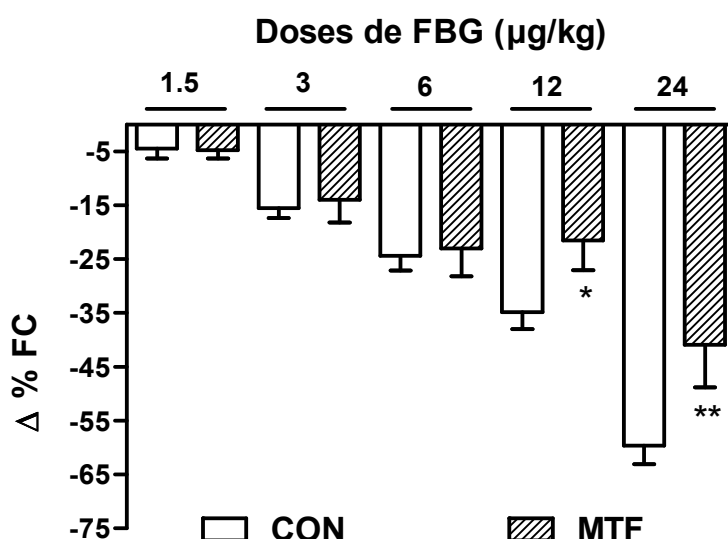


Figura 11: Delta percentual de frequência cardíaca ($\Delta\%FC$) frente à administração de doses crescentes de fenilbiguanida (FBG=1,5; 3,0; 6,0; 12 e 24 µg/kg) a ratos tratados agudamente com metamidofós (MTF; 8 mg/kg, n=9; barras hachuradas) ou com salina (CON; 0,9%, n=10; barras claras).

Valores expressos como média \pm EPM.

** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ indicam diferenças significantes em relação ao grupo controle para as respectivas doses.

4.5 AVALIAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO

A figura 12 mostra os resultados obtidos pela ativação do quimiorreflexo com doses crescentes de cianeto de potássio (KCN; 10, 20, 40 e 80 $\mu\text{g/rato}$) em ratos tratados com metamidofós (MTF; 8 mg/kg, n=14) e salina (CON; 0,9%, n=10). O tratamento com metamidofós não induziu alterações significativas na resposta pressora do quimiorreflexo nas diferentes doses testadas quando comparado ao grupo controle (figura 12, painel A). Em contrapartida, as respostas bradicárdicas do quimiorreflexo nas doses 20, 40 e 80 $\mu\text{g/rato}$, foram significativamente reduzidas nos animais tratados com metamidofós quando comparadas as respostas do grupo controle para as respectivas doses (figura 12, painel B).

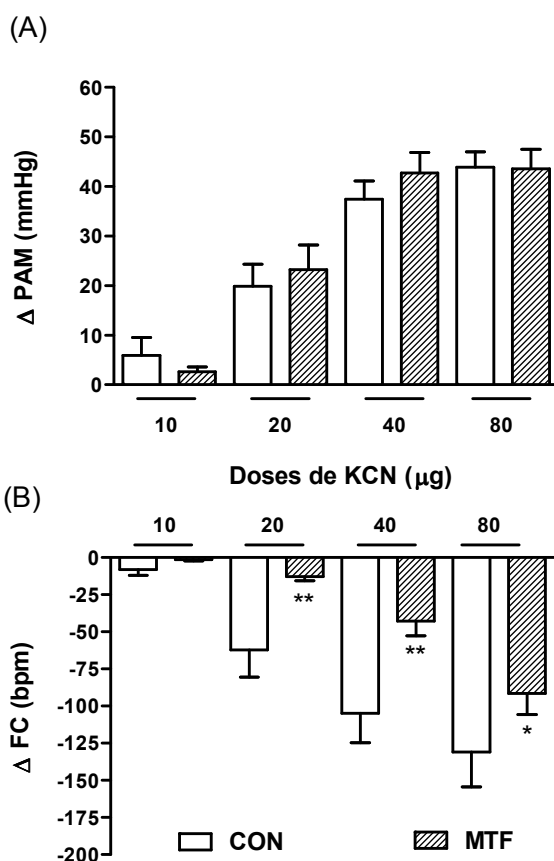


Figura 12: Deltas de pressão arterial média (PAM, painel A) e frequência cardíaca (FC, painel B), frente à administração de doses crescentes de cianeto de potássio (KCN; 10, 20, 40 e 80 $\mu\text{g/rato}$) em ratos tratados agudamente com metamidofós (MTF; 8 mg/kg, n=14; barras hachuradas) ou com salina (CON; 0,9%, n=10; barras claras). mmHg, milímetros de mercúrio; bpm, batimentos por minuto. Valores expressos como média \pm EPM.

** p<0,01 e * p<0,05 indicam diferenças significantes em relação ao grupo controle para as respectivas doses.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O tratamento com uma dose única e subletal de metamidofós induziu mudanças significativas em dois importantes reflexos envolvidos na regulação cardiovascular. Nossos dados mostraram que os ratos tratados com metamidofós apresentaram uma redução nas respostas bradicárdicas do quimiorreflexo e do RBJ. A dose letal efetiva mínima foi de 8 mg/kg (i.p.), conforme determinada no estudo de letalidade aguda em camundongos. Portanto, essa dose foi escolhida para os experimentos cardiovasculares em ratos, para simular uma exposição aguda ao metamidofós sem produzir efeitos letais.

A atenuação observada nas respostas bradicárdicas em ambos os reflexos sugere um desbalanço na regulação autonômica depois do tratamento com o metamidofós. Este desbalanço é, provavelmente, devido ao acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas, uma vez que esta classe de inseticidas transforma a enzima responsável pela degradação desse neurotransmissor em uma proteína enzimaticamente inerte por meio de uma ligação covalente ao seu sítio ativo (Clark, 2006). No presente estudo o tratamento com o metamidofós induziu uma marcante inibição (redução de 80% comparado ao grupo controle) da atividade da colinesterase plasmática, provando a efetividade do tratamento. De fato, a dosagem da atividade colinesterásica em tecidos facilmente acessíveis, tais como plasma e eritrócitos, provou ser um método sensível para o monitoramento da exposição a agentes anti-colinesterásicos, tais como os inseticidas organofosforados (Aygün et al, 2002; Oliveira-Silva et al, 2000).

Ao contrário do observado nas respostas reflexas, o tratamento com metamidofós não induziu alterações nos níveis basais de PAM e FC em comparação aos animais controle. Esses dados se contrapõem àqueles mostrados por vários estudos clínicos, em que o envenenamento por compostos OF, inclusive o próprio metamidofós (Wu et al., 2001), induz marcantes alterações na PAM e FC dos pacientes expostos (Anand et al., 2009; Davies et al., 2008; Saadeh et al., 1997; Yurumez et al., 2007). Essa diferença observada pode se dever ao grau de intoxicação apresentada nos estudos clínicos e a dose adotada no presente

trabalho. Enquanto que, os dados clínicos envolvem uma grande variedade de compostos OF envolvidos nos casos de envenenamento bem como diferentes vias de absorção e diferentes doses a que estes pacientes foram expostos, nossos resultados baseiam-se em uma exposição a doses subletais de metamidofós. É possível assim, que a dose utilizada em nosso estudo não seja capaz de promover alterações significativas nestes parâmetros. Adicionalmente, uma vez que em nosso estudo as medidas dos parâmetros cardiovasculares só ocorreram 48 horas após o tratamento, é possível que as alterações nos níveis basais, se presentes, pudessem não ser mais detectáveis após este período.

Por outro lado, a dose utilizada em nosso estudo foi capaz de induzir alterações dos componentes bradicárdicos de ambos os reflexos mesmo sendo avaliadas 48 horas após o tratamento. Essas respostas bradicárdicas decorrentes da ativação dos reflexos estudados envolvem tanto uma ativação da via eferente parassimpática quanto uma retirada do simpático cardíaco (Spyer, 1990). Sabe-se que a acetilcolina é um neurotransmissor encontrado nos gânglios simpático e parassimpático, modulando a liberação de noradrenalina e acetilcolina, respectivamente. De acordo com estudos clínicos (Anand et al., 2009; Karki et al., 2004; Saadeh et al., 1997), um dos efeitos mais observados na frequência cardíaca após a intoxicação aguda por OF é a taquicardia sinusal, característica de um aumento da atividade simpática. Deste modo, é possível que a inibição da colinesterase possa induzir maior ativação do sistema simpático após uma exposição aguda ao inseticida, o que poderia contribuir para a redução das respostas bradicárdicas encontradas em nosso estudo. É intrigante, entretanto, a ausência de efeitos nas respostas hipertensoras do quimiorreflexo observada nos animais tratados com uma dose única de metamidofós. Vale ressaltar que o quimiorreflexo possui a habilidade única de ativar simultaneamente a via simpática para os vasos sanguíneos levando à resposta hipertensiva e aumentar a atividade vagal para o coração produzindo bradicardia (Kara et al., 2003). Em nosso estudo, os animais tratados com o metamidofós não apresentaram alterações significativas nas respostas hipertensivas do quimiorreflexo. Esta inconformidade dos efeitos observados poderia envolver uma ação dos OF sobre diferentes alvos além da acetilcolinesterase ou até mesmo, a influência de outros mecanismos não-neurais responsáveis pela regulação cardiovascular. Sabe-se que a regulação da pressão arterial envolve também

mecanismos não-neurais, tais como: mecanismos locais metabólicos (O_2 , CO_2 , K^+ entre outros); parácrinos/autácrinos (histamina, prostaglandinas, etc); fatores endoteliais e hormonais. É possível assim que uma ação indiscriminada dos OF sobre alguns destes sistemas possa estar tamponando possíveis efeitos sobre a PA. De fato, Newbal et al. (1986) demonstraram *in vitro* e *in vivo*, que o gás Soman, um composto OF, induz a liberação de histamina em mastócitos peritoniais de ratos.

Vários trabalhos têm demonstrado que tanto a exposição a níveis reduzidos de OF quanto envenenamento agudo por estes compostos podem conduzir a um número de efeitos neurotóxicos, que não parecem estar relacionados exclusivamente à inibição da acetilcolinesterase (Katz et al, 1997; Pope, 1999; Ray e Richards, 2001; Smulders et al, 2004). Alguns estudos têm mostrado que estes inseticidas interagem com outros alvos, tais como receptores muscarínicos (Howard e Pope, 2002; Howard et al, 2007; Huff e Abou-Donia, 1995; Huff et al, 1994; Silveira et al, 1990). De fato, tem sido demonstrado que o receptor muscarínico do subtipo M2, predominante no coração (Lefkowitz et al., 1996), é um alvo de ligação direta de alguns compostos OF (Howard e Pope, 2002; Howard et al., 2007; Huff et al., 1994; Silveira et al., 1990). Experimentos *in vitro* realizados por Bomser e Casida (2001) demonstraram que o clorpirifós, um OF, causa dietilfosforilação em um sítio específico dos receptores M2 em corações de ratos. Embora, não esteja bem determinado se essa interação resulta em uma ação agonista ou antagonista do OF, algumas evidências fisiológicas apontam para a dessensibilização aguda dos receptores muscarínicos expostos a essa classe de inseticidas. Overstreet e colaboradores (1977) mostraram uma subsensibilidade ao efeito hipotérmico induzido pelo agonista colinérgico pilocarpina, após a injeção aguda do OF, diisopropilfluorofosfato, em ratos. De forma semelhante, ratos expostos ao dissulfoton, um outro composto OF, desenvolveram tolerância tanto aos efeitos antinociceptivos quanto à hipotermia induzida por oxotremorina, um agonista colinérgico muscarínico, efeito que parece ser devido a uma redução na afinidade dos receptores muscarínicos para o agonista (Costa et al., 1982). Apesar de nenhum estudo ter investigado os efeitos da interação dos OF a receptores muscarínicos sobre os reflexos cardiovasculares, é provável que uma subsensibilidade dos receptores muscarínicos possa também estar presente na função cardíaca após à exposição aguda aos compostos organofosforados.

Considerando o exposto acima, pode-se sugerir que a redução das respostas bradicárdicas dos reflexos cardiovasculares observadas neste estudo possam ser resultantes de uma diminuição da sensibilidade dos receptores muscarínicos cardíacos. É possível ainda, que uma combinação da ação tóxica tanto sobre a acetilcolinesterase quanto sobre esses receptores possam contribuir para os efeitos cardiovasculares observados após a exposição ao metamidofós.

Considerando ainda a toxicidade exercida por compostos OF sobre o sistema cardiovascular, um outro aspecto investigado em nosso estudo foi a possibilidade de um efeito cardiotóxico direto do tratamento com uma dose subletal do metamidofós. Em nosso trabalho, nenhuma alteração significativa nos níveis de CK-MB e LDH foi observado no grupo tratado com metamidofós quando comparado ao grupo controle. Na prática clínica, aumentos nas taxas dessas enzimas são interpretados como marcadores de dano celular no miocárdio (Godoy et al., 1998). Alguns estudos têm relatado que intoxicações agudas por organofosforados podem ser acompanhadas de danos na membrana de células musculares (De Bleecker, 1995; John et al., 2003). Particularmente, John e colaboradores (2003) demonstraram uma associação entre o desenvolvimento da síndrome intermediária a compostos OF e o aumento da atividade das enzimas creatina quinase e lactato desidrogenase. Esta síndrome pode ocorrer num período de 24-96 horas pós-intoxicação aguda por compostos OF, sendo caracterizada por uma intensa fraqueza muscular, freqüentemente, sem fasciculações e sinais colinérgicos nos pacientes intoxicados (Clark, 2006). Embora, a síndrome intermediária seja bem conhecida como uma doença das junções neuromusculares, sua exata etiologia, incidência e fatores de riscos não estão claramente definidos. Entretanto, alguns elementos podem estar relacionados a esta síndrome, tais como: o metabolismo tardio de compostos OF devido a fatores toxicocinéticos ou mesmo prejuízo na função orgânica, severidade da intoxicação, elevação das enzimas musculares, terapia tardia no uso do antídoto e intoxicações por compostos organofosforados específicos (dimetoato, metilparation, paration, metamidofós, entre outros) (De Bleecker et al., 1993; Yang e Deng, 2007). Conforme citado anteriormente, uma característica proeminente na síndrome intermediária é a fraqueza muscular, a qual pode ser atribuída à necrose do tecido muscular e ao desenvolvimento de miopatia. Todavia, a miopatia e esta síndrome apresentam uma origem comum que corresponde ao acúmulo de acetilcolina (Karalliedde et al., 2006)

e isto tem levado à especulação que a miopatia está envolvida na indução da síndrome intermediária. No estudo de John e colaboradores, os pacientes, que desenvolveram essa síndrome e os que tiveram uma ampla duração dessa condição, foram os que possuíram um maior dano muscular. Do mesmo modo, Saadeh e colaboradores (1997) mostraram que dos 46 pacientes que foram admitidos no hospital com o diagnóstico de intoxicação por compostos OF e carbamatos, 5 tiveram aumento tanto da CK-MB quanto da LDH. Friedman e colaboradores (2003) mostraram aumento dos níveis de CK em pacientes após uma exposição aguda a agrotóxicos anticolinesterásicos. Esses dados clínicos contradizem nossos resultados em que a atividade dessas enzimas não se mostrou alterada nos animais tratados com metamidofós. É possível que a ausência de efeitos sobre o tecido miocárdico possa ser devido à dose empregada em nosso estudo. Adicionalmente, devido à diversidade de agrotóxicos presentes nos casos de intoxicação, às diferentes vias de exposição bem como a incerteza das doses as quais os indivíduos foram expostos, torna-se difícil estabelecer uma correlação direta com os dados clínicos. É importante ressaltar ainda que, apesar do uso destes marcadores como indicativos de lesão celular miocárdica, há limitações no uso dos mesmos, uma vez que a especificidade da dosagem da LDH fica comprometida em casos de acometimento muscular esquelético associado a danos cardíacos. Além disso, a sensibilidade da CK-MB, às vezes, não é suficientemente alta para detectar pequeno dano miocárdico, face à imprecisão analítica das medidas de atividade e à ampla faixa de normalidade (Hamm & Katus, 1995).

Em suma, os nossos resultados mostraram que a exposição aguda a uma dose subletal de MTF prejudica a função de dois importantes reflexos envolvidos na manutenção da pressão arterial. Este efeito pode ser um mecanismo que contribua para a toxicidade cardiovascular associada a exposição aguda aos compostos OF. Todavia, se estas disfunções cardiovasculares observadas após o tratamento agudo com o metamidofós podem contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em indivíduos expostos cronicamente a esta classe de inseticidas, permanece por ser investigado.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho avaliou os efeitos da exposição aguda a uma dose subletal do inseticida metamidofós sobre os reflexos cardiocirculatórios e sobre a atividade das enzimas CK-MB, LDH e colinesterase plasmática. Os resultados obtidos demonstraram que:

1. O tratamento com metamidofós atenuou significativamente as respostas bradicárdicas do RBJ e do quimiorreflexo, sem promover alterações significativas nas respostas hipertensivas do quimiorreflexo.
2. O tratamento com metamidofós não alterou significativamente os valores basais de pressão arterial média e frequência cardíaca dos animais expostos.
3. O tratamento com metamidofós promoveu uma redução significativa da atividade da colinesterase plasmática, sem promover alterações significativas nas atividades da CK-MB e LDH.

Os dados apontam para uma disfunção no componente bradicárdico dos dois reflexos, o que pode envolver uma diminuição da sensibilidade de receptores muscarínicos cardíacos. Entretanto, os mecanismos exatos envolvidos no prejuízo da bradicardia reflexa permanecem por ser elucidados.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ABIFINA. Defensivos Agrícolas - notícias. In: Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades, [2009?]. Disponível em: <<http://www.abifina.org.br/noticiaSecao.asp?secao=1¬icia=76>>. Acesso em: 28 fev. 2012.

ANAND, S.; SINGH, S.; NAHAR SAIKIA, U.; BHALLA, A.; PAUL SHARMA, Y.; SINGH, D. Cardiac abnormalities in acute organophosphate poisoning. **Clinical Toxicology**, 47(3), 230-235, 2009.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica do metamidofós. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a12f9200474592189a97de3fbc4c6735/Nota+t%C3%A9cnica+do+metamidof%C3%B3s.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 28 fev. 2012.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista de Saúde Pública**, 40(2): 361-3, 2006.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC Nº 1, de 14 de janeiro de 2011. **Regulamento técnico para o ingrediente ativo Metamidofós em decorrência da reavaliação toxicológica**. Diário Oficial da União, Brasília, 17 jan. 2011.

ARAÚJO, A. J.; LIMA, J. S.; MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; SOARES, M. O.; MONTEIRO, M. C. M.; AMARAL, A. M.; KUBOTA, A.; MEYER, A.; COSENZA, C. A. N.; NEVES, C.; MARKOWITZ, C. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, 12(1): 115-130, 2007.

ARAÚJO, M. T.; BARKER, L. A.; CABRAL, A. M.; VASQUEZ, E. C. Inhibition of nitric oxide synthase causes profound enhancement of the Bezold-Jarisch reflex. **American Journal of Hypertension**, 11: 66-72, 1998.

AVIADO, D. M.; AVIADO, D. G. The Bezold-Jarisch reflex. A historical perspective of cardiopulmonary reflexes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 940: 48-58, 2001.

AYGUN, D.; DOGANAY, Z.; ALTINTOP, L.; GUVEN, H.; ONAR, M.; DENIZ, T.; SUNTER, T. Serum acetylcholinesterase and prognosis of acute organophosphate poisoning. **Journal of Toxicology**, 40(7), 903-910, 2002.

BERGEMEYER, H. U. **Lactate dehydrogenase**. In: Bergemeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, second ed. Academic Press, New York, pp. 576-579, 1974.

BISCOE, T. J. Carotid body: structure and function. **Physiological Reviews**, 51: 437-495, 1971.

BOCHNER, R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, 12(1): 73-89, 2007.

BOMSER, J. A.; CASIDA, J. E. Diethylphosphorylation of rat cardiac M2 muscarinic receptor by chlorpyrifos oxon in vitro. **Toxicology Letters**, 119(1), 21-26, 2001.

BRASIL. Lei n.º 7.802, de 11 de julho de 1989. **Dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, 12 jul.1989, Seção 1, p. 11459-11460.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria Nº 10, de 08 de março de 1985. **Atribui à DINAL a compilação da relação de substâncias com ação tóxica sobre animais ou plantas, cujo registro pode ser autorizado no Brasil, em atividades agropecuárias e em produtos domissanitários e determina outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, 14 mar. 1985.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria Nº 3, de 16 de janeiro de 1992. **Diretrizes e exigências referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins**. Diário Oficial da União, Brasília, 04 fev. 1992.

CALDAS, E. D.; REBELO, F. M.; HELIODORO, V. O.; MAGALHÃES, A. F. A.; REBELO, R. M. Poisonings with pesticides in the Federal District of Brazil. **Clinical Toxicology**, 46: 1058-1063, 2008.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, 34(5): 529-37, 2000.

CALIFORNIA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Human exposure assessment for methamidophos**. 2005. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/whs/pdf/hs1825.pdf> >. Acesso em: 07 mar. 2012.

CAMPAGNA, J. A.; CARTER, C. Clinical relevance of the Bezold-Jarisch reflex. **Anaesthesia**, 98: 1250-60, 2003.

CHEIN, H. I. Interaction between the baroreceptor and Bezold-Jarisch reflexes. **American Journal of Physiology**, 237(6): 655-61, 1979.

CHHARBA, M. L.; SEPAHA, G. C.; JAIN, S. R.; BHAGWAT, R. R.; KHANDEKAR, J. D. ECG and necropsy changes in organophosphorus compound (malathion) poisoning. **Indian Journal of Medical Sciences**, 24:424-9, 1970.

CHIANCA, D. A.; MACHADO, B. H. The sensitivity of the Bezold-Jarisch reflex is increased in rats with sinoaortic deafferentation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 27: 775-781, 1994.

CLARK, R. F. **Inseticides: Organic phosphorus compounds and carbamate**. In: Goldfrank's Toxicologic Emergencies. Edited by: Flomenbaum N.E.; Goldfrank LR; Hoffman R.S.; Howland M.A.; Lewin N.A.; Nelson L.S. McGraw-Hill, pp. 1497-1512, 2006.

COLERIDGE, J. C. G.; COLERIDGE, H. M.; KIDD, C. Cardiac receptors in dogs, within particular reference to two types of afferent ending in the ventricular wall. **Journal of Physiology (Lond)**, 174: 323-339, 1964.

COLLETT, D. **Modelling binary data**. Chapman and Hall/CRC, Florida, 2003.

COSTA, L. G.; SCHWAB, B. W.; MURPHY, S. D. Differential alterations of cholinergic muscarinic receptors during chronic and acute tolerance to organophosphorus insecticides. **Biochemical Pharmacology**, 31(21), 3407-3413, 1982.

COYE, M. J.; BARNETT, P. G.; MIDTLING, J. E.; et al. Clinical confirmation of organophosphate poisoning by serial cholinesterase analyses. **International Archives of Medicine**, 147: 438-442, 1987.

CROSSLEY, J.; TUTASS, H. O. Metabolism of Monitor insecticide by rats. Unpublished report from Chevron Chemical Co. Submitted to WHO by Bayer/Tomen, 1969.

DAVIES, J.; ROBERTS, D.; EYER, P.; BUCKLEY, N.; EDDLESTON, M. Hypotension in severe dimethoate self-poisoning. **Clinical Toxicology**, 46: 880–884, 2008.

DAWES, G. S. Studies on veratrum alkaloids. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 89: 325-342, 1947.

DE BLEECKER, J. The intermediate syndrome in organophosphate poisoning: an overview of experimental and clinical observations. **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, 33, 683–686, 1995.

DE BLEECKER, J.; VAN DEN NEUCKER, K.; COLARDYN, F. Intermediate syndrome in organophosphorus poisoning: a prospective study. **Critical care medicine**, 21, 1706–1711, 1993.

DELGADO, I. F; PAUMGARTTEN, F. J. R. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, 20(1): 180-186, 2004.

DIBONA, G. F. Neural control of renal function: cardiovascular implications. **Hypertension**, 13: 539-548, 1989.

DIETZ, A. A.; RUBENSTEIN, H. M.; LUBRANO, T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine dithiobis (nitrobenzoic acid) procedure. **Clinical Chemistry**, 8: 41-46, 1977.

EASTON, J.; HOWE, A. The distribution of thoracic glomus tissue (aortic bodies) in the rat. **Cell and Tissue Research**, 232: 349-356, 1983.

ECOBICHON, D. J. **Toxic effects of pesticides**. In: Klaassen, C.D. (Ed.) Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill, New York, pp. 763-810, 2001.

EDDLESTON, M.; BUCKLEY, N. A.; EYER, P.; DAWSON, A. H. Management of acute organophosphate pesticide poisoning. **Lancet**, 371: 597–607, 2008.

EDDLESTON, M.; EYER, P.; WOREK, F.; MOHAMED, F.; SENARATHNA, L.; VON MEYER, L.; JUSZCZAK, E.; HITTARAGE, A.; AZHAR, S.; DISSANAYAKE, W.; SHERIFF, M. H. R.; SZINICZ, L.; DAWSON, A. H.; BUCKLEY, N. A. Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: a prospective cohort study. **Lancet**, 366: 1452–1459, 2005.

EDDLESTON, M.; MOHAMED, F.; DAVIES, J. O. J.; EYER, P.; WOREK, F.; SHERIFF, M. H. R.; BUCKLEY, N. A. Respiratory failure in acute organophosphorus pesticide self-poisoning. **Quimical Journal Medicine**, 99: 513–522, 2006.

ETO, M.; OKABE, S.; OZOE, Y.; MACKAWA, K. Oxidative activation of O, S-dimethyl phosphoramidothioate. **Pesticide Biochemical Physiology**, 7, 367-377, 1977.

FELDER, R. B.; MIFFLIN, S. W. **Baroreceptor and chemoreceptor afferent processing in the solitary tract nucleus**. In: Barraco IRA (Editor), Nucleus of the Solitary Tract. CRC Press, London, 169-186, 1994.

FILHO, E. S.; SILVA, R. S.; BARRETO, H. H. C.; INOMATA, O. N. K.; LEMES, V. R. R.; KUSSUMI, T.A.; ROCHA, S. O. B. Grau de exposição a praguicidas organoclorados em moradores de aterro a céu aberto. **Revista de Saúde Pública**, 37 (4): 515-522, 2003.

FLETCHER, E. C.; LESSKE, J.; QIAN, W.; MILLAR, C. C.; UNGER, T. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. **Hypertension**, 19: 555-61, 1992.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Decision Guidance Documents – Methamidophos**. Roma, 1996.

FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, E. M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 42: 63–70, 1993.

FRIEDMAN, L. S.; BRAUTBAR, N.; BARACH, P.; WOLFE, A. H.; RICHTER, E. D. Creatine phosphate kinase elevations signaling muscle damage following exposures to anticholinesterases: 2 sentinel patients. **Archive Environmental Health**, 58: 167–171, 2003.

FUKUDA, Y.; SATO, A.; TRZEBSKI, A. Carotid chemoreceptor discharge responses to hypoxia and hypercapnia in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 19, 1–11, 1987.

GODOY, M. F.; BRAILE, D. M.; NETO, J. P. Troponina como marcador de injúria miocárdica. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, volume 71, (nº 4), 1998.

GRAY, A. J., THOMPSON, C. M.; FUKUTO, T. R. Distribution and excretion of [14 CH3S] methamidophos after intravenous administration of a toxic dose and the relationship with anticholinesterase activity. **Pesticide Biochemical Physiology**, 18, 28-37, 1982.

HABECK, J. O. Peripheral arterial chemoreceptor and hypertension. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 34: 1-8, 1991.

HAIBARA, A. S.; COLOMBARI, E.; CHIANCA DA, J. R., BONAGAMBA L. G.; MACHADO, B. H. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. **American Journal of Physiology**, 269: H1421-1427, 1995.

HAMM, C. W.; KATUS, H. A. New biochemical markers for myocardial cell injury. **Curr. Opin. Cardiology**, 10: 355-60, 1995.

HOWARD, M. D.; MIRAJKAR, N.; KARANTH, S.; POPE, C. N. Comparative effects of oral chlorpyrifos exposure on cholinesterase activity and muscarinic receptor binding in neonatal and adult rat heart. **Toxicology**, 238, 157–165, 2007.

HOWARD, M. D.; POPE, C. N. In vitro effects of chlorpyrifos, parathion, methyl parathion and their oxons on cardiac muscarinic receptor binding in neonatal and adult rats. **Toxicology**, 170 (1–2), 1–10, 2002.

HUFF, R. A.; ABOU-DONIA, M. B. In vitro effect of chlorpyrifos oxon on muscarinic receptors and adenylate cyclase. **Neurotoxicology**, 16 (2), 281–290, 1995.

HUFF, R. A.; CORCORAN, J. J.; ANDERSON, J. K.; ABOU-DONIA, M. B. Chlorpyrifos oxon binds directly to muscarinic receptors and inhibits cAMP accumulation in rat striatum. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, 269 (1), 329–335, 1994.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). **Methamidophos - Health and Safety Guide**, n. 79, 1993.

JEYARASASINGAM, G.; YELUASHVILI, M.; QUIK, M. Nitric oxide is involved in acetylcholinesterase inhibitor- induced myopathy in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 295: 314-20, 2000.

JOHN, M.; OOMMEN, A.; ZACHARIAH, A. Muscle injury in organophosphorous poisoning and its role in the development of intermediate syndrome. **Neuro Toxicology**, 24, 43–53, 2003.

JOKANOVIC, M.; KOSANOVIC, M. Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 29: 195–201, 2010.

KAPPAGODA, C. T.; LINDEN, R. J.; SNOW, H. M. The effect of stretching the superior vena cava-right atrial junction on right atrial receptors in the dog. **Journal of Physiology**, 227: 875-887, 1972.

KARA, T.; NARKIEWICZ, K.; SOMERS, V. K. Chemoreflexes-physiology and clinical implications. **Acta Physiology Scand.**, 177(3), 377-84, 2003.

KARALLIEDDE, L.; BAKER, D.; MARRS, T. C. Organophosphate-induced intermediate syndrome: aetiology and relationships with myopathy. **Toxicology Review**, 25, 1-14, 2006.

KARKI, P., ANSARI, J. A., BHANDARY, S., KOIRALA, S. Cardiac and electrocardiographical manifestations of acute organophosphate poisoning. **Singapore medical journal**, 45(8), 385-389, 2004.

KASHIHARA, K.; KAWADA, T.; MEIHUA, L.; SUGIMACHI, M.; SUNAGAWA, K. Bezold-Jarisch reflex blunts arterial baroreflex via the shift of neural arc toward lower sympathetic nerve activity. **The Japanese Journal of Physiology**, Vol.54, 395-404, 2004.

KATZ, E. J.; CORTES, V. I.; ELDEFRAWI, M. E.; ELDEFRAWI, A. T. Chlorpyrifos, parathion, and their oxons bind to and desensitize a nicotinic acetylcholine receptor: Relevance to their toxicities. **Toxicology and applied pharmacology**, 146, 227–236, 1997.

KISS, Z.; FAZEKAS, T. Arrhythmias in organophosphate poisonings. **Acta Cardiology**, 34:323-30, 1979.

KOCK, L. L. Histology of the Carotid Body. **Nature**, 167:611-612, 1951.

KRAYER, O. The history of the Bezold-Jarisch effect. **Naunyn-Schmiedeberg's Archiv fur Experimentelle Patologie und Pharmakologie**, 240: 361-368, 1961.

KWONG, T. C. Organophosphate Pesticides: Biochemistry and Clinical Toxicology. **Therapeutic Drug Monitoring**, 24: 144-149, 2002.

LARINI, L. **Toxicologia dos Praguicidas**. São Paulo: Manole; pp. 47-75, 1999.

LEFKOWITZ, R. J.; HOFFMAN, B. B.; TAYLOR, P. **Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems**. In: Hardman, J. G., Limbird, L. L., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., Gilman, A. G. (Eds.), Goodman, Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, ninth ed. McGraw-Hill, New York, pp. 105-139, 1996.

MACHADO, B. H. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 179-196, 2001.

MAHAJNA, M.; CASIDA, J. E. Oxidative bioactivation of methamidophos insecticide: synthesis of N-hydroxymethamidophos (a candidate metabolite) and its proposed alternative reactions involving N→O rearrangement or fragmentation through a metaphosphate analogue. **Chem. Res. Toxicology**, 11(1): 26-34, 1998.

MARSHALL, J. M. Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. **Physiological Reviews**, 74: 543-593, 1994.

MENDONÇA, R. T.; MARINHO, J. L. Discussão sobre intoxicações por medicamentos e agrotóxicos no Brasil de 1999 a 2002. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 2 (2), 45-63, 2005.

MEYRELLES, S. S.; BERNARDES, C. F.; MODOLO, R. P.; MILL, J. G.; VASQUEZ, E. C. Bezold-Jarisch reflex in myocardial infarcted rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 63: 144-152, 1997.

MEYRELLES, S. S.; MAUAD, H.; MATHIAS, S. C.; CABRAL, A. M.; VASQUEZ, E. C. Effects of myocardial hypertrophy on neural reflexes controlling cardiovascular function. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 73(2-3): 135-42, 1998.

MEYRELLES, S. S.; MILL, J. G.; CABRAL, A. M.; VASQUEZ, E. C. Cardiac baroreflex properties in myocardial infarcted rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 60: 163-8, 1996.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. Livraria Varela, São Paulo, pág.189-232, 2000.

MOSS, D. W.; HENDERSON, A. R. **Enzimas**. Em: Tietz Fundamentos de Química Analítica. Editado por: Burtis, A.B.; Ashwood, E.R. Guanabara Koogan, 275-325, 1998.

MUERS, M. F.; SLEIGHT, P. The reflex cardiovascular depression, caused by occlusion of the coronary sinus in the dog. **Journal of Physiology** (Lond), 221: 259-282, 1972.

NAMBA, T.; NOLTE, C.; JACKREL, J.; GROB, D. Poisoning due to organophosphate insecticides. **American Journal Medical**, 50: 475-92, 1971.

NARKIEWICZ, K.; VAN DE BORNE, P. J. H.; MONTANO, N. et al. The contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. **Circulation**, 97, 943-945, 1998.

NETO, A. J. S.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração de fase sólida (SPE) utilizando discos C18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de Furnas (MG-Brasil). **Química Nova**, Vol. 28, 5: 747-750, 2005.

NEWBALL, H. H.; DONLON, M. A.; PROCELL, L. R.; HELEGESON, E. A.; FRANZ, D. R. Organophosphate-induced histamine release of histamine release from mast cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 238, 839-845, 1986.

NOUIRA, S.; ABROUG, F.; ELATROUS, S.; BOUJDARIA, R.; BOUCHOUCHA, S. Prognostic value of serum cholinesterase in organophosphate poisoning. **Chest**, 106: 1811-1814, 1994.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; INACIO, A. F.; MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; MATTOS, R. C.; FERREIRA, M. F. A.; CUNHA, J. C.; MOREIRA, J. C. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. **Human & experimental toxicology**, 19, 173-177, 2000.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P. N.; MATTOS, R. C. O. C.; MOREIRA, J. C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 35 (2): 130-135, 2001.

O'MALLEY, M. Clinical evaluation of pesticide exposure and poisoning. **Lancet**, 349: 1161–1166, 1997.

OPAS/OMS (Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde). **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, 1996.

OVERSTREET, D. H.; HELPS, S. C.; PRESCOTT, A. M.; SCHILLER, G. D. Development and disappearance of subsensitivity to pilocarpine following a single administration of the irreversible anticholinesterase agent, DFP. **Psychopharmacology** (Berl). 52(3): 263-269, 1977.

PAINTAL, A. S. A study of ventricular pressure receptors and their role in the Bezold-Jarisch reflex. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, 40: 348-363, 1955.

PAINTAL, A. S. Vagal sensory receptors and their reflex effects. **Physiological Reviews**, 53: 159-227, 1973.

PEOTTA, V. A.; VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S. Cardiovascular neural reflexes in L-NAME-induced hypertension in mice. **Hypertension**, 38: 555-9, 2001.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

POPE, C. N. Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? **Journal Toxicology and Environmental Health**, Part B 2, 161–181, 1999.

RAY, D. E.; RICHARDS, P. G. The potential for toxic effects of chronic, low dose exposure to organophosphates. **Toxicology Letters**, 120, 343–351, 2001.

RECENA, M. C. P.; PIRES, D. X.; CALDAS, E. D. Acute poisoning with pesticides in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Sci. Total Environmental**, 357: 88-95, 2006.

ROBERTSON, D.; HOLLISTER, A. S.; FORMAN, M. B.; ROBERTSON, R. M. Reflexes unique to myocardial ischemia and infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, 5: 99B-104B, 1985.

ROTH, A.; ZELLINGER, I.; ARAD, M.; ATSMON, J. Organophosphates and the heart. **Chest**, 103: 576–582, 1993.

SAADEH, A. M., FARSAKH, N. A., AL-ALI, M. K. Cardiac manifestations of acute carbamate and organophosphate poisoning. **Heart**, 77, 461-464, 1997.

SALAMA, A. K. M. **Toxicological studies on some insecticides. Pharmacokinetics, placental transfer, milk transfer, and metabolism studies of [¹⁴CH₃S] methamidophos and/or [¹⁴C]-acephate in rat.** Dissertation, Alexandria University, Faculty of Agriculture. Submitted to WHO by Bayer/Tomen, 1990.

SAPRU, H. N.; KRIEGER, A. J. Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat. **Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology**, 42: 344-348, 1977.

SCHULTZ, H. D. Cardiac vagal chemosensory afferents. Function in pathophysiological states. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 940: 59-73, 2001.

SCHULTZ, H. D.; LI, Y. L. Carotid body function in heart failure. **Respir. Physiology Neurobiology**, 157(1), 171–185, 2007.

SILVEIRA, C. L. P.; ELDEFRAWI, A. T.; ELDEFRAWI, M. E. Putative M2 muscarinic receptors of rat heart have high affinity for organophosphorus anticholinesterase. **Toxicology Appl. Pharmacology**, 103, 474–481, 1990.

SINDAG – Informações sobre o setor agroquímico. In: - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, 2011. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2143> Acesso em: 03 mar. 2012.

SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas). Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Circunstância. Brasil, 2009. Centro de Informações Científica e Tecnológicas (Cict/Fiocruz), Rio de Janeiro. Brasil, 2009. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>> Acesso em: 24 jan. 2012.

SMITH, P.; JAGO, R.; HEATH, D. Glomic cells and blood vessels in the hyperplastic carotid bodies of spontaneously hypertensive rats. (Abstract). **Cardiovascular research**, 18: 471-482, 1984.

SMULDERS, C. J. G. M.; BUETERS, T. J. H.; VAILATI, S.; VAN KLEEF, R. G. D. M.; VIJVERBERG, H.P.M. Block of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors by Organophosphate Insecticides. **Toxicological sciences**, 82, 545–554, 2004.

SOMERS, V. K.; MARK, A. L.; ABBOUD, F. M. Potentiation of sympathetic nerve responses to hypoxia in borderline hypertensive subjects. **Hypertension**, 11, 608–612, 1988a.

SPYER, K. M. **The central nervous organization of reflex circulatory control**. In: Central Regulation of Autonomic Functions. Oxford University Press, Loewy, A.D., Spyer, K.M. (Eds.), New York, pp. 168– 188, 1990.

SZASZ, G.; GRUBER, W.; BERNT, E. Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. **Clinical Chemistry**, v.22: p.650-656, 1976.

TRZEBSKI, A. Arterial chemoreceptorreflex and hypertension. **Hypertension**, 19: 562- 6, 1992.

TRZEBSKI, A.; MALGORZATA, T.; ZOLTOWSKI, M.; PRZYBYLSKI, J. Increased sensitivity of the arterial chemoreceptor drive in young men with mild hypertension. (Abstract). **Cardiovasc. Res.**, 16: 163-172, 1982.

UGGERE, T. A.; ABREU, G. R.; SAMPAIO, K. N.; CABRAL, A. M.; BISSOLI, N. S. The cardiopulmonary reflexes of spontaneously hypertensive rats are normalized after regression of left ventricular hypertrophy and hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 33(5): 589-594, 2000.

VALE, J. A. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (organophosphate) insecticide poisoning. **Toxicology Letters**, 102-103: 649–652, 1998.

VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S.; MAUAD, H.; CABRAL, A. M. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 30 (4), 521–532, 1997.

VERBERNE, A. J.; GUYENET, P. G. Medullary pathway of the Bezold-Jarisch reflex in the rat. **American Journal of Physiology**, 263(6 Pt 2): R1195-202, 1992.

VERBERNE, A. J.; SAITA, M.; SARTOR, D. M. Chemical stimulation of vagal afferent neurons and sympathetic vasomotor tone. **Brain Research Reviews**, 41: 288-305, 2003.

WU, M. L.; DENG, J. F.; TSAI, W. J.; GER, J.; WONG, S. S.; LI, H. P. Food Poisoning Due to Methamidophos - Contaminated Vegetables. **Clinical Toxicology**, 39(4): 333–336, 2001.

YANG, C. C.; DENG, J. F. Intermediate syndrome following organophosphate insecticide poisoning. **Journal of the Chinese Medical Association**, 70, 467–472, 2007.

YURUMEZ, Y.; DURUKAN, P.; YAVUZ, Y.; IKIZCELI, I.; AVSAROGULLARI, L.; OZKAN, S.; AKDUR, O.; OZDEMIR, C. Acute organophosphate poisoning in university hospital emergency room patients. **Internal Medicine**, 46 (13): 965-969, 2007.

ZANCHETTI, A.; MANCIA, G. Cardiovascular reflexes and hypertension. **Hypertension**, 18 (supl. III): III-13 – III-21, 1991.

ZUCKER, I. H. Left ventricular receptors: physiological controllers or pathological curiosities. **Basic Research in Cardiology**, 81: 539-557, 1989.

TRABALHOS PUBLICADOS